

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÖNTEMİYLE KÜÇÜK ÇAPLI VASKÜLER  
GREFTLERİN BİYOREAKTÖRDE İNŞA EDİLMESİ**

**Bio. Hülya MUTLU**

**Eczacılık Temel Bilimleri Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2010**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÖNTEMİYLE KÜÇÜK ÇAPLI VASKÜLER  
GREFTLERİN BİYOREAKTÖRDE İNŞA EDİLMESİ**

**Bio. Hülya MUTLU**

**Eczacılık Temel Bilimleri Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

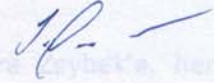
**Danışman  
Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM**

**ANKARA  
2010**

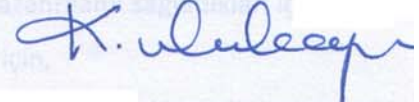
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Eczacılık Temel Bilimleri Programında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

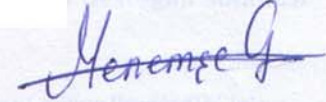
Jüri Başkanı: Prof. Dr.S.İsmet Deliloğlu Gürhan  
(Ege Üniversitesi)



Tez danışmanı: Prof.Dr. Kezban Ulubayram  
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu  
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu  
(Hacettepe Üniversitesi)



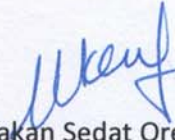
Üye: Yrd. Doç. Dr. Ayşe Ercan  
(Hacettepe Üniversitesi)



ONAY

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan Sedat Orer  
Enstitü Müdürü



Y.

## TEŞEKKÜR

Tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a bana vermiş olduğu bilimsel destek ve imkanlarla birlikte bu süreçte zamanını ve deneyimini benden esirgemediği için,

Sayın Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'a hücre kültürü teknikleri ve çalışmam boyunca vermiş olduğu bilimsel destek ve güleryüz için,

Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu ve Yrd. Doç. Dr. Dilara Zeybek'e, her türlü yardımları ve çalışmamızın histolojik aşamasını gerçekleştirirken deneysel becerilerini benimle paylaşarak bu konuda deneyim kazanmamı sağladıkları için,

Doç. Dr. Nezire Saygılı'ya desteği ve güleryüzü için,

Sevgili hocam Öğr. Gör. Dr. Hakan Eroğlu'na her konuda desteğini sunması ve yaptığı ağabeylik için,

Sevgili hocam Öğr. Gör. Dr. Yeliz Tunç'a desteği ve beni sosyalleştirdiği için,

Sevgili dostum Zeliha Aydoğan'a her zaman yanımda olduğu ve hem güler yüzüyle hem de bilimsel birikimiyle beni desteklediği için,

Sevgili Mehmet Özgün Özen'e her ihtiyacım olduğunda bilgisiyle ve sabrıyla bana yardım ettiği ve gösterdiği güzel arkadaşlık için,

Çalışma arkadaşlarım Ece, Soner ve Mine'ye destekleri, yardımları ve arkadaşlıkları (ve beni böyle beğendikleri) için,

Her şeye rağmen yanımda olan Berker İlhan'a; bunca kahrımı çektiği için,

Ve sonsuz sevgileriyle her zaman beni destekleyen ve yanımda olan, dolayısıyla bu tezi kendilerine ithaf ettiğim sevgili anneme, babama, canım kardeşime ve kedilerime

çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Mutlu, H. Doku Mühendisliği Yöntemiyle Küçük Çaplı Vasküler Greftlerin Biyoreaktörde İnşa Edilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Temel Bilimleri Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010.** Aterosklerotik vasküler hastalıklar (koroner arter ve periferik) dünyadaki en önemli ölüm sebebidir. Bu hastalıkların temel tedavisi “bypass” greftlemedir. Vasküler rekonstrüktif cerrahide kullanılan otolog kan damarlarına alternatif olarak küçük çaptaki (<6 mm) damarlara ciddi anlamda ihtiyaç duyulmaktadır. Vasküler doku mühendisliği, biyolojik ve işlevsellik açısından gerçek bir damarla kıyaslanabilecek vasküler greftler üretmek için umut verici bir yaklaşım ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın amacı; küçük çaplı vasküler greftlerin biyoreaktör içinde inşa edilmesi ve 3 boyutlu büyüme özelliklerinin incelenmesidir. Bu amaçla otolog düz kas hücreleri (SMC) modifiye edilmiş tübüler poliglikolik asit (PGA) meşlerin üzerine ekilmiş ve laboratuvarımızda kendi tasarladığımız el yapımı biyoreaktörler içerisinde, 37<sup>0</sup>C ve % 10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda çeşitli sürelerle inkübe edilmişlerdir. Daha sonra orta tabakanın iç yüzeyi (lümen) kollajen solüsyonuyla (adesiv protein) muamele edilmiş ve lümenine endotel hücreleri (EC) ekilmiştir. EC’lerle yapılan kültürden sonra, gerçek bir damarın temel yapısına benzeyen, iki tabakadan oluşan vasküler greft elde edilmiştir. Damar morfolojisinin, kültür süresinin 12 haftaya kadar artmasıyla birlikte geliştiği gözlenmiştir. Mühendislik damarları, hücre ekimi için kullanılan PGA meşlerden bir artık kalmamasıyla genel görünümü itibariyle gerçek bir damar yapısına çok benzemektedir. Damar duvarını oluşturan SMC’ler oldukça lamelli bir yapıda organize olmuş, kollajen fiberleriyle ayrılmış tabakalar arasında konumlanmıştır. Gerçek bir damarda olduğu gibi kollajen tip I ve tip III hem hücre içinde hem de hücrelerin dışında bulunmuştur. Diğer taraftan yapıda çok ince de olsa elastik fiberlerin varlığı tespit edilmiştir. EC’lerin lümeninde tek sıra halinde bir yapı oluşturduğu saptanmıştır. Damarın gerilim kuvveti 3.1 MPa ve uzama % 35 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, mühendislik damarlarının elastik ve kollajen tip I’in yüksek seviyesine bağlı olarak mekanik kuvvete, ayrıca tek sıra halinde dizilmiş bir endotelyum tabakasına sahip olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışması sonuçlarının vasküler doku mühendisliği alanındaki bilgilerimize katkı sağlayacağını ve gelecekte in vitro’da doku mühendisliği yoluyla elde edilecek insan arterleri üzerine yapılacak çalışmalar için güçlü bir temel oluşturacağını umuyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Doku mühendisliği, vasküler greft, düz kas hücresi, endotel hücresi, endotelyum

**Destekleyen Kuruluş:** Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No: 107S036).

## ABSTRACT

**Mutlu, H. Construction of Tissue Engineered Small Diameter Vascular Grafts in a Bioreactor. Hacettepe University Health Sciences Institute MSc Thesis in Basic Pharmaceutical Sciences, Ankara, 2010.** Atherosclerotic vascular diseases, in the form of coronary artery and peripheral vascular diseases are the largest cause of mortality in the world. The major treatment of these vascular diseases is bypass grafting. There is a considerable clinical need for small diameter (< 6 mm) vascular graft alternatives to autologous blood vessels used in vascular reconstructive surgeries. Vascular tissue engineering represents a promising approach to generating a vascular graft that is biologically and functionally comparable to native vessels. Aim of this study was to construct engineered small diameter vascular grafts in a bioreactor and identify their 3-dimensional growth characteristics. For this purpose autologous smooth muscle cells (SMCs) were seeded onto the modified tubular polyglycolic acid (PGA) mesh and cultured at 37 °C and with 10 % CO<sub>2</sub> for several times in a homemade bioreactor which was designed in our laboratory. Later, the inner surface of media layer (luminal) was treated with collagen solution (as adhesive proteins) and then seeded with endothelial cells (ECs). After culture with ECs, a two-layered vascular graft was formed that presented the basic structure of a native artery. It was observed that vessel morphology improved as time in culture increases 12 weeks. Engineered vessels had a gross appearance similar to that of native vessels with no grossly visible evidence of the original PGA mesh scaffold that was used for cell seeding. SMCs in the engineered vessel wall were organized into a highly lamellar structure, with cells separated by alternating layers of collagen fibrils. Collagen types I and III were found to be intracellular as well as extracellular as it occurs in native vessel. On the other hand very thin elastic fibers were observed in our construct. ECs were observed in the lumen settled in a monolayered morphology. The tensile strength of the vessel was measured as 3.1 MPa and the elongation as 35 %. These results indicate that the engineered vessel has an elastic character and mechanical strength due to the high levels of collagen type I, also a monolayered endothelium. The outcome of this thesis is expected to add great deal to our knowledge of vascular tissue engineering and will help to form a strong base for the future studies that will be planned in the field of tissue engineering human arteries in vitro.

**Keywords:** Tissue engineering, vascular graft, smooth muscle cell, endothelial cell, endothelium

**Supporting Institute:** The Scientific and Technological Council of Turkey (Project No: 107S036).

**İÇİNDEKİLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	iii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iv
<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Ateroskleroz	4
2.1.1. Otolog Greftler	5
2.1.2. Sentetik Greftler	6
2.2. Vasküler Doku Mühendisliği	8
2.3. Kan Damarları	10
2.3.1. Kan Damarlarının Anatomisi	11
2.3.1.1. Tunika intima (iç tabaka)	12
2.3.1.2. Tunika media (orta tabaka)	12
2.3.1.3. Tunika eksterna/adventisya (dış tabaka)	13
2.3.1.4. Arterler	13
2.3.1.5. Kapillerler	17
2.3.1.6. Venler	18
2.3.1.7. Arter ve venlerin farkları	21
2.3.1.8. Endotelyum ve damarlanma	21
2.3.1.9. Endotelyum ve biyokimyasal düzenlemeler	22

	<b>Sayfa</b>
2.4. Vasküler Doku Mühendisliğindeki Gelişmeler	28
2.4.1. Hücre Kaynakları	29
2.4.2. Doku İskeleleri	29
2.4.2.1. Kollajen temelli vasküler greftler	30
2.4.2.2. Kendiliğinden düzenlenmiş (self-assembly) vasküler greftler	31
2.4.2.3. Biyobozunur polimerik temelli vasküler greftler	33
2.4.2.4. Hüresiz doku iskelesi yaklaşımı	34
2.4.3. Kokültür Çalışmaları	36
2.4.4. Klinik Çalışmalar	39
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>43</b>
3.1. Gereçler	43
3.2. Yöntem	44
3.2.1. Sterilizasyon	44
3.2.2. Kültür Kaplarının Kollajen ile Kaplanması	44
3.2.3. Endotel ve Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü	44
3.2.4. Endotel ve Düz Kas Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Karakterizasyonu	45
3.2.5. Hücrelerin Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi	47
3.2.6. PGA Meşlerin Yüzey Modifikasyonu	48
3.2.7. Biyoreaktör Sisteminin Tasarlanması	48
3.2.8. Biyoreaktörde Doku Mühendisliği Vasküler Greftlerin İnşa Edilmesi	49
3.2.8.1. Orta tabakanın oluşturulması	49
3.2.8.2. Endotelyumun oluşturulması	50
3.2.9. Vasküler Greftlerin Karakterizasyonu	52
3.2.9.1. İmmunohistokimyasal karakterizasyon	52
3.2.9.2. Histolojik karakterizasyon	54
3.2.9.3. Vasküler Greftlerin Mekanik Karakterizasyonu	54

	<b>Sayfa</b>
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	56
4.1. PGA Meşlerin Yüzey Modifikasyonu	56
4.2. Hücrelerin Karakterizasyonu	59
4.2.1. Alfa-Düz Kas Aktin ( $\alpha$ -SMA) Filamentlerinin Varlığı	60
4.2.2. Kalponin Ekspresyonu	61
4.2.3. Miyozin Ağır Zincirlerin (MHC) Ekspresyonu	63
4.2.4. von Willebrand Faktör (vWB) Ekspresyonu	64
4.3. SMC ve EC Hücrelerin Büyüme Eğrileri	65
4.4. Doku Mühendisliği Vasküler Greftlerin Makroskopik Sonuçları	67
4.5. Doku Mühendisliği Vasküler Greftlerin İmmunhistokimyasal Özellikleri	69
4.5.1. Kültür Zamanının Damar Morfolojisine Etkisi	69
4.5.2. Alfa-Düz Kas Aktin Sentezi	78
4.5.3. Elastin Sentezi	84
4.5.4. Kollajen Tip I ve III Dağılımı	89
4.5.5. Endotelyum	94
4.5.6. Damar Greftlerin Mekanik Özellikleri	101
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	103
<b>KAYNAKLAR</b>	106

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$ -SMA	Alfa düz kas aktini
ACE	Anjiyotensin I dönüştürücü enzim
ALP	Alkalen fosfataz
BCIP/NBT	5-Bromo, 4-kloro, 3-indolilfosfat/nitro mavisini tetrazolyum klorür
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BSA	Sığır serum albumini
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CS	Kondrotin sülfat
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco'nun minimum esansiyel ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
EC	Endotel hücresi
ECM	Ekstraselüler matriks
EC TCPC	Extra Cardiac Total Cavopulmonary Connection
EDGF	Endotel kaynaklı gevşeme faktörü
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör
ET	Endotelin
FBS	Föetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Florosein izotiyosiyanat
GTEC	Georgia Tech/Emory Center for Tissue Engineering of Living Tissues
H&E	Hemotoksilen eozin
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HIF-1	Hipoksi ile uyarılan etmen
HS	Heparan sülfat
HUVEC	İnsan göbek kordon kanı endotel hücresi
Kol tip I	Kollajen tip I

LITA-LAD	Sol internal göğüs arteri – İnen koroner arter
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MHC	Miyozin ağır zinciri
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit
NO	Nitrik oksit
P4HB	Poli-4-hidroksibütirat
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PDGF-BB	Platelet kaynaklı büyüme faktörü-BB
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PET	Poliyeten teraftalat (Dacron®)
PGA	Poliglikolik asit
PGI <sub>2</sub>	Prostasiklin
PHA	Polihidroksialkonat
PTFE	Politetrafloroetilen
PU	Poliüretan
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik asit
SIS	Barsak submukozası
SMC	Düz kas hücresi
TEBV	Doku mühendisliği kan damarları
TEVA	Doku mühendisliği vasküler otogreftler
TEVG	Doku mühendisliği vasküler greftleri
TGF-b	Transforme edici büyüme faktörü-beta
tPA	Doku plazminojen inhibitörü
TRITC	Tetrametilrodamin
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VSMC	Damar düz kas hücresi
vWF	von Willebrand faktörü

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Aterosklerozun oluşumu	4
<b>2.2.</b> Vasküler doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi	9
<b>2.3.</b> Koroner dolaşım	11
<b>2.4.</b> Elastik arter	14
<b>2.5.</b> Müsküler arter	15
<b>2.6.</b> Elastik ve müsküler atar damarların kesitleri	16
<b>2.7.</b> Bir arteriyolün çapraz kesitinin ve dermisteki bir arteriyol ve venülün elektron mikrografı	16
<b>2.8.</b> Kılcalların sınıflandırılması	17
<b>2.9.</b> Orta çaplı ven	19
<b>2.10.</b> Orta çaplı bir venin boyuna kesidi	19
<b>2.11.</b> Geniş çaplı ven	20
<b>2.12.</b> Atar ve toplar damarların karşılaştırılması	21
<b>2.13.</b> Endotelyumun şekilsel ve elektron mikrograf görünümü	24
<b>2.14.</b> Bir endotel hücresinin çoklu işlevlerini gösteren şematik çizim	27
<b>3.1.</b> Biyoreaktörler	49
<b>3.2.</b> Biyoreaktörlere orta tabakanın oluşturulması için SMC'lerin ekilmesi, hazırlanmış biyoreaktör sistemi ve hücrelerin inkübasyonu	51
<b>3.3.</b> Biyoreaktörde oluşturulan orta tabaka ve endotel hücrelerinin damar lümenine ekilmesi	52
<b>3.4.</b> TEVG'nin mekanik analizi	55
<b>4.1.</b> SEM fotoğrafları	58
<b>4.2.</b> PGA meşlerin ATR-FTIR Spekturumu	59
<b>4.3.</b> SMC'lerin mikroskopik görüntüsü	60
<b>4.4.</b> EC'lerin mikroskopik görüntüsü	60
<b>4.5.</b> Alfa düz kas aktin ekspresyonu - immunoperoksidaz	61

	<b>Sayfa</b>
4.6. Alfa düz kas aktin ekspresyonu – immunofloresan	62
4.7. Kalponin ekspresyonu – immunoperoksidaz	62
4.8. Kalponin ekspresyonu – immunofloresan	63
4.9. Miyozin ağır zinciri ekspresyonu	63
4.10. von Willebrand faktör ekspresyonu – immunoperoksidaz	64
4.11. von Willebrand faktör ekspresyonu – immunofloresan	65
4.12. SMC'lerin büyüme eğrisi	66
4.13. EC'lerin büyüme eğrisi	66
4.14. Doku mühendisliği ile üretilmiş 12 haftalık damar örneği görüntüleri	68
4.15. 4 Haftalık damar örneğinde H&E boyaması	70
4.16. 6 Haftalık damar örneğinde H&E boyaması	71
4.17. 6 Haftalık damar örneğinde H&E boyaması (yüksek büyütme)	72
4.18. 4 Haftalık ve 6 haftalık damarların karşılaştırılması	74
4.19. 8 Haftalık damarda Masson's trikrom boyaması	75
4.20. 12 Haftalık damarda Masson's trikrom boyaması	77
4.21. 4 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu	79
4.22. 6 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu	80
4.23. 8 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu	81
4.24. 12 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu (peroksidaz)	82
4.25. 12 Haftalık damarın alfa düz kas aktin ekspresyonu (floresan)	83
4.26. 4 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması	86
4.27. 6 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması	87
4.28. 8 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması	87
4.29. 12 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması	88
4.30. 8 Haftalık damar kesitinde indirek immunoperoksidaz ile boyanmış kollajen tip I ve tip III reaktivitesi	90

	<b>Sayfa</b>
<b>4.31.</b> 12 Haftalık damar kesitinde indirek immunoperoksidaz ile boyanmış kollajen tip I ve tip III reaktivitesi	91
<b>4.32.</b> 12 Haftalık damar kesitlerinde kollajen tip III floresan görüntüsü	92
<b>4.33.</b> 12 Haftalık damar kesitlerinde kollajen tip I floresan görüntüsü	93
<b>4.34.</b> 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 12 saat sonraki görüntüleri	96
<b>4.35.</b> 8 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 7 gün sonraki görüntüleri	96
<b>4.36.</b> 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonraki görüntüleri-immunoperoksidaz	97
<b>4.37.</b> 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonraki görüntüleri-immunofloresan	99
<b>4.38.</b> 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonraki ikili boyama görüntüleri-immunofloresan	100
<b>4.39.</b> 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonra gerçekleştirile yüksek büyütmede ikili boyama görüntüsü -immunofloresan	101
<b>4.40.</b> TEVG'lerin gerilim-gerinim grafiği	102

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Kan damarlarının boyutlarının karşılaştırılması	20
<b>2.2.</b> Endotel hücrelerden sentezlenen ve salgılanan biyoaktif moleküller	25
<b>3.1.</b> Besiyerlerinin içerikleri	46
<b>3.2.</b> Damar greftlerin inşasında kullanılan hücre sayıları	50
<b>3.3.</b> İkili boyamada kullanılan primer ve sekonderler	53

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Aterosklerotik vasküler hastalıklar (koroner ve periferik vasküler hastalıklar) tüm dünyada ve Türkiye’de ölüm oranı en yüksek hastalıkların başında gelir (1). Genetik faktörün kalp damar hastalıklarında rol oynayan en temel etmenlerden biri olmasının yanında kötü beslenme, sigara içme ve hareketsizlik gibi yaşam kalitesini düşüren nedenler de bu hastalıklara ciddi zemin hazırlayabilmektedir.

Ateroskleroz, arterlerin çeşitli sebeplerle daralmasıyla meydana gelir. Koroner arterlerdeki bu daralma miyokardiyumun zayıflamasına ve koroner kan akışında azalmaya neden olur (2). Bunun sonucu anjina pectoris ya da miyokardiyal infarktüs gibi hastalıklar ortaya çıkar. Hastalıktan etkilenmiş damarların tedavisine yönelik geliştirilen yaklaşımların başında “bypass” greftleme gelmektedir. Bu cerrahi işlemde, çapı 6 mm’den büyük damarların tedavisinde politetrafloroetilen (ePTFE) ya da polietilenteraftalattan (PET veya ticari ismiyle Dacron®) üretilmiş sentetik greftler yüksek bir başarı oranıyla kullanılmıştır. Küçük çaplı damarların (<6 mm) “bypass” işleminde ise genellikle oto greftler (hastadan elde edilen safen venler, radial ve meme arterleri) kullanılmaktadır. Günümüzde oto greftler standart ve rutin bir kullanıma sahip olmalarına karşın, özellikle tekrar eden uygulamalarda sınırlı olmaları, hastanın acı çekmesi ve kaynak olarak kullanılan organdaki rahatsızlıklar sebebi ile alternatif yöntem ve teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer taraftan allojenik greftlerin uzun süreli bütünlük göstermelerine ve aktif olmalarına karşın ciddi bağışıklık sorunları, bu greftlerle yapılan klinik uygulamalar için engel oluşturmuştur. Uygun otolog damarların eksikliği sebebiyle cerrahi operasyonlarda ilgili damar bölgesine alternatif yol açmak üzere Dacron®, PTFE ve poliüretan (PU) gibi sentetik greftler geliştirilmiştir (3). Fakat bu malzemelerin iç çapı 6 mm’den küçük olduğunda uzun vadede başarı gösterememişlerdir. Örneğin; venöz ve PTFE dizüstü femoropoplietal “bypass” operasyonlarından iki yıl sonraki açıklık oranları sırasıyla % 80 ve % 69; 5 yıl sonra ise % 75 ve % 39’dur (4). Greftlerin başarısız olma sebepleri pıhtılaşma, enfeksiyon, sürekliliğinin sınırlı olması ve bazen greftlerin anastomoz noktalarında uyumsuzluk göstermesidir (5). Bu greftlerde çeşitli modifikasyonlara

gidilse de ne greftlerde ne de daha küçük ölçülerdekinde istenilen başarı sağlanabilmiştir. Bu nedenle vasküler rekonstrüktif cerrahi için ideal arter eşleniklerine duyulan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır ve küçük çapa sahip damarların üretilmesi zorunlu hale gelmiştir (3). Bu ihtiyaç birçok araştırmacıyı doku mühendisliği vasküler greftlerini geliştirmeye yönlendirmiştir. İdeal biyolojik greftlere sadece koroner arter “bypass” greftleme (CABG) için değil aynı zamanda alt organ (lower limb) “bypass” operasyonu, arteriovenöz şantlarında (arteriovenous shunts) (AV) ve kongenital hasarların tedavisinde ihtiyaç duyulmaktadır.

Doku mühendisliği fonksiyonunu yitirmiş veya zarar görmüş doku/organların yerine kullanılmak üzere, biyoloji, kimya ve mühendislik prensipleriyle laboratuvar ortamında deri, kıkırdak, kan damarları gibi doku ve organların üretimini amaçlayan multidisipliner bir alandır.

Vasküler doku mühendisliği ise canlı damarlarla biyolojik ve fonksiyonel olarak karşılaştırılabilecek vasküler greftler üretmek için umut verici bir yaklaşım ortaya koymaktadır (3). Bu yaklaşımda belirli kaynaklardan elde edilen hücrelerin (otojenik, kök, progenitör) laboratuvar ortamında çoğaltılıp kollajen jel ya da biyobozunur bir doku iskelesi üzerine ekilerek bir reaktör içinde (statik veya pulsatif şartlarda) belli süre inkübe edilmesiyle doku mühendisliği vasküler greftler (TEVG)’in oluşturulması amaçlanmaktadır. Bunun için araştırmacıların yıllardır hücre kültürü, biyoreaktör ve taşıyıcı sistemler üzerinde çalışarak, *in vivo*’yu *in vitro*’da en iyi şekilde taklit etmek için yeni teknikler geliştirme çabaları devam etmektedir.

İdeal bir doku mühendisliği greftinin canlı dokudan meydana gelmesi, hemodinamik ve kimyasal mediatörlere cevap olarak kasılması, normal bir damarın yaptığı salgıları yapması ve herhangi bir immunolojik cevap vermeden kendi kendini yenileme potansiyeline sahip olması gerekmektedir (6). Ayrıca greftin dokuya uyum göstermesi, pıhtılaşma göstermemesi, yeterli patlama basıncına sahip olması ve uzun ömürlü olması amaçlanan özelliklerdendir (7).

Doku mühendisliği yöntemiyle üretilen deri ve kıkırdak hali hazırda marketlerde yer almıştır ve büyük bir piyasa oluşturmuş durumdadır. Hayvan testleri süren dokular arasında bağırsak, idrar kesesi, omurilik ve ses telleri örnek

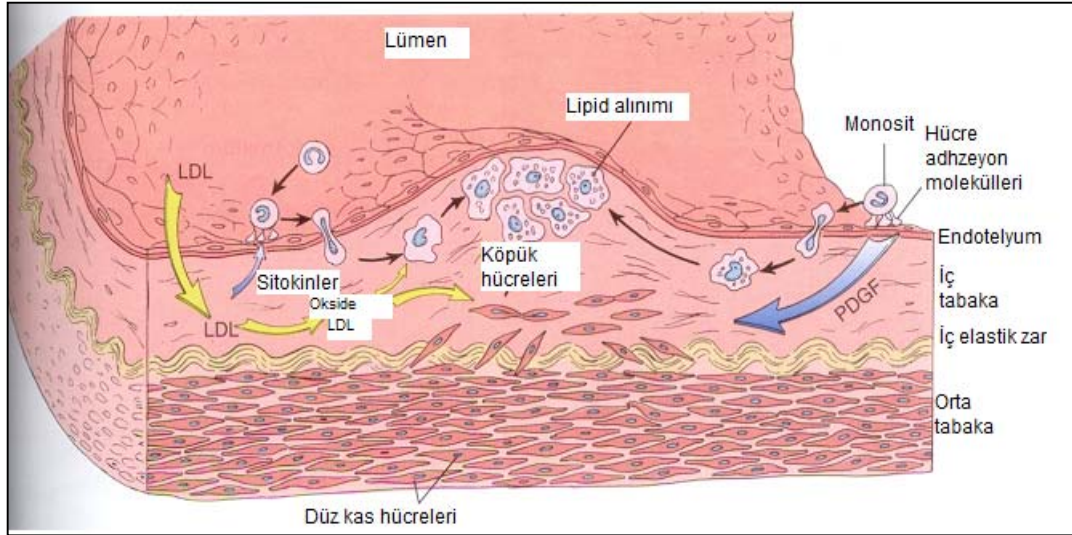
olarak verilebilir. Üretilmiş dokuların birçoğu, örneğin; kırıkta, kemik, kornea ve damar insanlarda denenmektedir. Ancak yapılan araştırmalar damar ve kalp kapakçıkları gibi daha karmaşık yapıları laboratuvar ortamında üretmenin sanıldığından daha uzun süreceğinin sinyallerini vermektedir. Vasküler doku mühendisliğı alanında son yıllarda önemli gelişmeler gösterilmiştir. Ancak klinik uygulamalarda daha umut verici sonuçlar elde etmek için biyolojik açıdan uyumlu, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlayacak ve doğru şekillendirecek biyomalzemelere yani hücre taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasına ve geliştirilmesine, yeni hücre kaynaklarının kullanılmasına ihtiyaç vardır.

Bu bilgilerin ışığında, tez çalışmamızda hücre kültür tekniklerinin ve uygun hücre taşıyıcı (iskelet) sistemlerin kullanılarak vasküler doku mühendisliğı yaklaşımı ile otolog hücrelerden *in vitro* koşullarda biyolojik damar greftlerin tasarlanması ve inşa edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla genç sığır damar biyopsilerinden düz kas (SMC) ve endotel hücrelerinin (EC) izolasyonları, belirlenmiş koşullarında kültür edilmeleri, çoğaltılmaları ve karakterizasyonları planlanmıştır. Daha sonra 2 katmanlı bir damar yapısını oluşturmak üzere bu hücrelerin hiyerarşik bir düzen içinde yapılanması öngörülmüştür. Bunun için önce düz kas hücrelerinin modifiye edilmiş tübüler PGA meşlerin üzerine ekilerek bu amaçla tasarlanan biyoreaktör sistemlerinde farklı sürelerde kültür edilmesi ile statik koşullarda media tabakası oluşturulması ve daha sonra endotelyumun oluşturulması amaçlanmıştır. Farklı kültür şartlarında ve zamanlarında oluşturulan vasküler greftlerin kesilerek, makroskopik gözlemler ve immunohistokimyasal değerlendirmeler ile kan damarları yapısına uygunluğunun araştırılması planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, kalp damar hastalıklarının içinde yer alan en önemli hastalıktır. Ateroskleroz, kan damarlarının duvarının çeşitli nedenlerle sertleşmesi ve kalınlaşması sonucunda meydana gelir. Bu sebeplerden biri kalsiyum tuzlarının düz kas tabakasında dereceli olarak birikerek kalsifikasyon yaratmasıdır. Bu sorun yaşa bağlı olarak gerçekleşebildiği gibi diyabet ya da endokrin rahatsızlıkları nedeniyle de meydana gelebilir. Plazmadaki kolesterol seviyesi fazla yükseldiği zaman monositler bunları kan dolaşımından uzaklaştırmaya çalışır ve bu sırada lipid tanecikleriyle dolarlar. Bu yüklü monositler endotel hücrelerine yapışarak büyüme faktörlerinin salgılanmasına, böylece düz kas hücrelerinin çoğalmasına neden olur ve damar duvarı kalınlaşmaya başlar. Ya da endotelium lipid moleküllerini emer ve iç tabakada lipid birikimine neden olur (8).



**Şekil 2.1.** Aterosklerozun oluşumu. Endotel hücrelerinin endotel adhezyon moleküllerini salgılayarak monositlerin ve PDGF'yi salgılayarak düz kas hücrelerinin iç tabakaya göçü ve lipid granülleriyle dolmuş köpük hücrelerinin iç tabakada birikerek tabakayı kalınlaştırması (9).

Aterosklerozun tedavisinde plak oluşumu erken safhadaysa ilaç kullanılarak kolesterol seviyesi düşürülmeye çalışılır. Bu arada hasta besin diyetine girer, egzersiz yapılması ve sigara içilmemesi önerilir. Fakat hastalık ileri seviyedeyse ve ilaçla çözülemeyecek duruma geldiye kateterizasyon, balon anjiyoplasti ve son çare olarak da “bypass” ameliyatları gerçekleştirilebilir. “Bypass”, kelime olarak atlama ya da kısa devre anlamına gelmektedir. “Bypass” işlemiyle vücudun başka yerinden alınan damarlar aortaya bağlanarak, daralmış ya da tıkanmış bu bölgelerin ilerisinin beslenmesi sağlanmış olur (10). Otolog damarlar ve sentetik greftler “bypass” ameliyatlarında sıklıkla kullanılan materyallerdir.

### 2.1.1. Otolog Greftler

“Bypass”ta kullanılan damarlar; hastanın bacağından alınan safen ven, göğüs içinden alınan internal meme arteri, koldan alınan radyal arter ve karın içindeki mide arteri olabilir. Safen venleri, bacakta boylu boyunca uzanan ve vasküler greft olarak kullanılan en önemli kaynakların başında gelir. Hem uzunluğu, çapı, koroner, femoral ve popliteal (diz arkası) arterlerine olan benzerliğinden hem de bilateral ve kolay alınabilir olmasından dolayı tercih edilmektedir (11). Fakat günümüzde yapılan koroner arter “bypass”larında kullanılan safen venlerinde, ameliyattan 1 sene sonra % 10-15 oranında, 10 sene sonra % 30 ve % 40 oranında daralma (oklüzyon) gerçekleşmektedir (3,11). Perifer vasküler “bypass” ameliyatında en uygun ven femoropoplietal’den elde edilen safen vendir; iki yıl boyunca % 82’lik açıklık gösterirler. Fakat hastaların çoğu vasküler hastalıklar ve bunlara bağlı olarak cerrahi işlemlerin zorluğu nedeniyle uygun safen vene sahip olmayabilir (3). Venöz yapılar aynı zamanda vazomotor tonu ayarlamaya yeterli değildir ve pıhtılaşma ile daralmaya yatkındır (12).

İnternal meme arterinin kullanıldığı LITA-LAD (left internal thoractic artery - descending coronary artery) greftleri, ateroskleroz geç evrede değilse ve erken ameliyat yapılmışsa 20 yıl sonra bile % 90 açıklıkla günümüzde en uygun “bypass” greftleri olarak kabul edilmektedir. Doktorlar, daha fazla LITA ve daha az safen veni

gibi özelliklere sahip olan greftlerin üretilmesi gerektiğini düşünmektedirler (11). Fakat tüm bu damar kaynakları, zaten kalp-damar sisteminde sorun olan, hatta belki daha önceden “bypass” ameliyatı geçirmiş bu hastalarda uygun ve sağlıklı olmayabilir. Ameliyat süreci sıkıntılı ve acı verici olabilir. Damarlar “bypass” işleminden sonra gerçek damarın yerini tutmayabilir ve bazen tekrarlanması gereken ameliyatlara olabilir (3). Bu nedenle bazı sentetik damar greftleri üretilerek bu sıkıntılar çözülmeye çalışılmıştır.

### 2.1.2. Sentetik Greftler

Uygun otolog damarların eksikliği sebebiyle araştırmacılar tarafından PET, ePTFE ve PU'dan elde edilmiş protezler geliştirilmiştir (2,13). PU, PET ve ePTFE'e göre daha biyouyumlu bir malzemedir. PU'ların yanında daha sonra üretilen segmentli PU'lar daha uygun elastik özelliklere sahip olmaları nedeniyle klinik aşamalarda kullanılmış fakat daralma ve bozunma sebebiyle istenilen başarı elde edilememiştir (14). Daha sonra “MyoLink” adıyla üretilen PU ve polikarbonattan meydana gelmiş yapıların daha öncekilere göre daha uyumlu ve mekanik açıdan kararlı oldukları bildirilmiştir (15).

Sentetik yapıların, küçük çaptaki (< 6mm) damar alanlarında yeterli uyumu sağlayamadıkları ve ciddi pıhtılaşma oranına sahip oldukları görülmüştür (12). Bu nedenle sentetik greftlerde kan ve malzeme etkileşimini en aza indirmek için yüzeyi proteinle ya da hücrelerle kaplama gibi çeşitli yüzey modifikasyonlarına gidilmiştir (2,16). Buna rağmen 6 mm'den küçük çapa sahip greftlerdeki pıhtılaşma sorunu aşılammış ve üretilen greftlerde başarı sağlanamamıştır. Yapılan tüm bu modifikasyonlar, özellikle greftlerin iç yüzeylerinin endotel hücreleriyle kaplanması gerçek bir damar yapısına yaklaşma konusunda çalışmaların ilerlemesine ve vasküler doku mühendisliğiyle ilgili çalışmaların ağırlık kazanmasına aracı olmuştur.

PTFE inert bir florokarbon polimerdir. ePTFE, biyobozunur olmayan, elektronegatif lüminal yüzeyiyle pıhtılaşmayı engelleyen ve 7-9 mm çaplarındaki “bypass” greftlerinde başarılı sonuçlar veren bir malzemedir (3). Dacron vasküler

greft şekline sokulmak suretiyle dokunmuş ya da örülmüş birden fazla filamentin bir araya geldiği poliester bir yapıdır. 6-10 mm çaplarındaki damar greftleri ile yapılan klinik müdahalelerde greft çapı geniş olduğu için başarı sağlanmıştır. Buna rağmen 2-6 mm gibi düşük çaplı damar greftleri, oklüzyon ya da kan akışının yavaşlaması sebebiyle meydana gelen pıhtılaşma sorunları sonucu kapanmaktadır (2,17); dolayısıyla klinik uygulamalarda istenilen sonuç elde edilememiştir. Sonuçta ePTFE ve Dacron vücuda yabancı malzemelerdir ve kanın bu yüzeylerden akmasıyla fibrin ve pıhtı oluşumuna neden olan bir dizi tepkime meydana gelmektedir. Bu nedenlerden dolayı bu greftlerde pıhtılaşmayı engelleyecek yöntemlere gidilmiştir. Bunlardan biri kullanılan balon kateterler ve koroner stentler gibi klinik cihazların antiplatelet ve antikoagülant etmenlerle muamele edilmesidir. Yüzey değişikliğinin temel amacı, malzemenin yığın yapısını değiştirmeden yüzeyinde değişiklik yapmaktır. Bu da pıhtılaşmayı önleyen ajanların kovalent ya da iyonik olarak bağlanması ya da polimerik yapıya fiziksel olarak dağıtılması şeklinde gerçekleştirilir (17). Yapılan çalışmalar lüminal yüzeye heparin bağlanarak antitrombojenik bir yüzeyin elde edilmesinin yanında (18), bu yüzeylere hastadan alınan otolog EC'lerin ekilmesiyle doğal bir antitrombojenik yüzeyin oluşturulmasını da içerir (2). EC'lerin bağlanabilmesi için Mazzucotelli ve çalışma grubu arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid dizisini ePTFE greft yüzeyinde EC'leri bağlayan fibronektin benzeri bir adhezyon faktörü olarak kullanırken, Sipehia ve çalışma grubu da amonyak plazma kullanmış ve yüzeye amin ve amid gruplarını iyonik bağla bağlayarak hücrelerin yüzeyindeki asidik N-asetil nöraminik asitle bu grupları etkileştirmiştir (16,19). Burada kullanılan EC'ler venöz dolaşımdaki endoteller, mezotelyal endoteller, mikrovasküler endoteller ve endotel progenitör hücreleridir (20). Bu EC'lerin bağlanması, herhangi bir molekülle kaplanmamış yüzeye nazaran daha olumlu sonuçlar verse de bu yöntemin de çeşitli sınırlamaları mevcuttur. Biyobozunur olmayan, yapay bir malzeme vasküler sistemin normal davranışının gerçekleşmesini engeller. Damar hücrelerinin normal koşullar altında salgıladıkları kollajen ve elastin gibi yapıların sentezlenmesi engellenir. Benzer bir şekilde, böyle bir yapı, vazoaaktif bileşiklerin göstereceği etkilerin kaybedilmesine yol açar. Vazotonun kaybedildiği

ortamlarda hücreler aşırı üreyerek intimal hiperplaziye sebep olabilir (2). Sonuç olarak “bypass” ameliyatlarında kullanılacak ideal bir biyolojik grefte olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır.

## 2.2. Vasküler Doku Mühendisliği

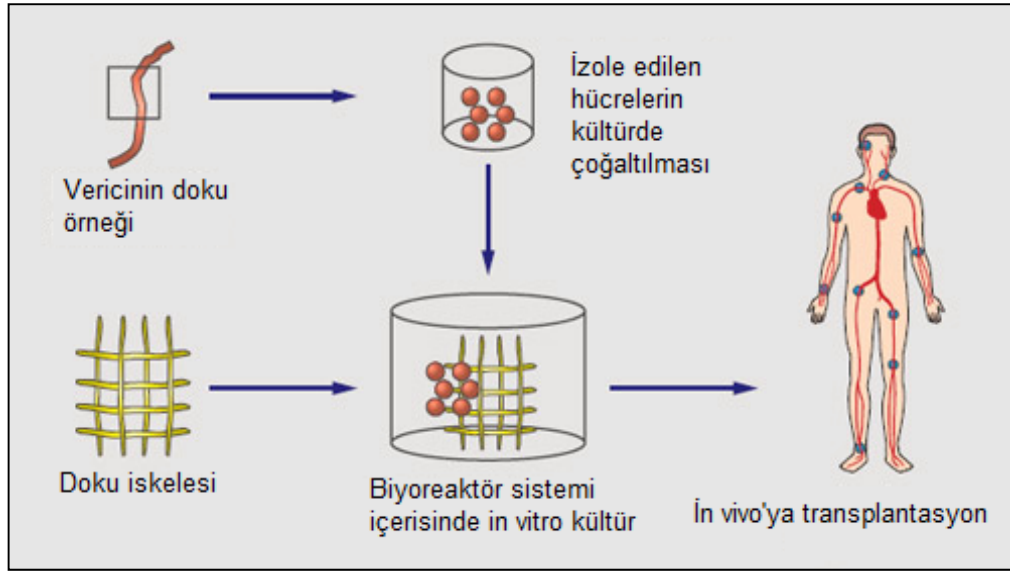
Gerek genetik olarak gerekse yaşa bağlı olarak gelişen damar hastalıklarının tedavisinde her ne kadar ilaç kullanılsa da kalıcı bir tedavi sağlanamamaktadır. Dünyada koroner arter ve perifer vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan temel tedavi yöntemi, “bypass” greftlerinin kullanılmasıdır. Yukarıda bahsedildiği gibi venöz damarların pıhtılaşmaya ve kapanmaya yatkın olması nedeniyle arterlerin yerini tutamaması ve arter greftlerinin de istenilen sağlıkta ve sıklıkta elde edilememesi nedeniyle bu damarların yerini tutabilecek sentetik greftler geliştirilmiştir (21). Fakat 6 mm’den küçük çaptaki greftler de istenilen başarıyı gösterememiştir. Küçük çapa sahip damar ihtiyacında karşılaşılan bu sıkıntılar sonucunda doğal yapıları olabildiğince taklit eden ve daha etkili çözümlerin üretilmesi yoluna gidilmiştir.

Vasküler doku mühendisliği, hücreleri ve çeşitli doku iskeleleri yöntemlerini kullanarak gerçek damarların işlevsel özelliklerine sahip biyolojik yapıların üretilmesidir. Genel yöntem şematik olarak Şekil 2.2’de verilmiştir. Bu teknik; canlıdan alınan biyopsi örneğinden izole edilen hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılarak, tübüler bir hücre taşıyıcı matris üzerine ekilerek, yine bu amaçla geliştirilmiş reaktör içinde ve gerekli çevresel koşullar altında biyolojik damarlar elde edilmesidir.

1998’de “Georgia Tech/Emory Center for Tissue Engineering of Living Tissues (GTEC)” kurulduğunda küçük çaplı damarların doku mühendisliği yoluyla elde edilmesi hakkında üç adet çekirdek teknolojiye bahsetmiştir (2). Bunlardan ilki “hücre teknolojisi”dir. Gerçek bir damar yapısı düzgün ve tek sıra bir endotel ile kasılabilir düz kas hücreleri olmadan oluşturulamaz. Dolayısıyla küçük çaptaki bir damarın oluşumunda bu hücrelerin yapısı, kaynağı vs. önemli bir rol oynayacaktır. Bu teknolojiyi “hücre kaynağı” ve “hücre işlevlerinin kontrolü ve düzenlenmesi”

olarak iki başlığa ayırmak mümkündür. Hücre kaynağı, kullanılan hücrelerin hangi canlıdan alındığı (otolog, allojenik, zenojenik), hücresel işlevlerin kontrolü ise hücrelerin ekstraselüler doğasının ve genetiğinin istenilen yönde nasıl değiştirilebileceğini kapsar.

İkinci çekirdek teknoloji “yapı teknolojisi”dir. Bunu uygularken hücrelerin 3 boyutlu ortamda nasıl dizilecekleri, bunun sonucunda yapay bir damarın gerçek bir damara hem yapı hem işlev olarak ne kadar benzeyebileceği değerlendirilir. Fakat yapı teknolojisi bunun da ötesindeki sorulara cevap arar. Eğer amaç Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi’nden (FDA) onay almış, ticari olarak üretilebilecek bir damar elde etmekse, bunun raf ömrü, seri üretimi vb. sorunların da göz önünde bulundurulması gereken noktalardır.



**Şekil 2.2.** Vasküler doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi.

Üçüncü çekirdek teknoloji ise *in vitro*'da üretilmiş yaşayan hücrelere sahip yapıyı, hayvan ya da insan klinik çalışmalarında işlevsel olarak kullanabilmeyi ele alır. Burada, sorunun boyutları seçilen canlı modelinden bir diğerine değişiklik gösterse de, biyolojik cevaplar (bağışıklık sistemi cevapları) ve biyolojik olarak dokunun kabulü en kritik sorunları oluşturmaktadır (2).

Vasküler doku mühendisliğinde bu uygulamaların nasıl gerçekleştirileceğini anlamak için önce gerçek kan damarlarının fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin irdelenmesinde yarar vardır.

### 2.3. Kan Damarları

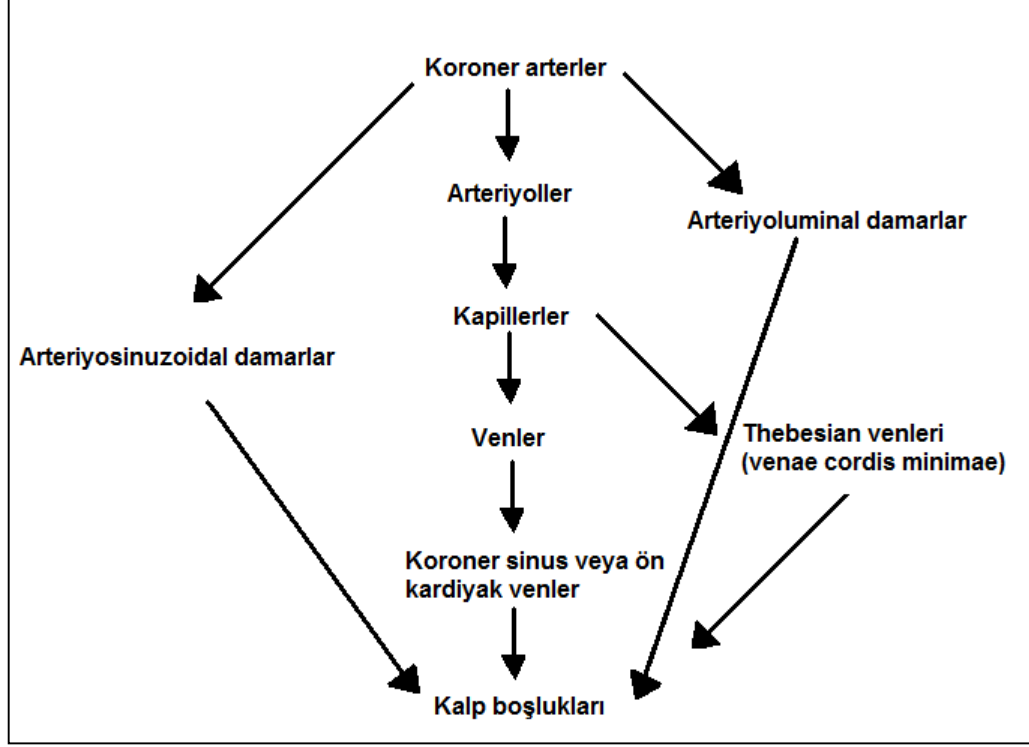
Kan damarları ve kan hücreleri histolojik olarak mezodermden köken alır. Kardiyovasküler sistemde 5 çeşit damar sınıfı bulunmaktadır. Bu damarlar; kanı kalpten bütün vücuda dağıtmak üzere taşıyan arterler, perifer dokulara giren ve çapları küçülen arteriyoller, arteriyollerden daha küçük çaplara daralan ve difüzyonun gerçekleştiği kapillerler, buradan kanın girdiği venüller ve kanı tekrar kalbe götürmek üzere venüllerin birleşerek oluşturdukları daha büyük çapa sahip olan venlerdir.

Kan, kalbi sol ventrikülden çıkan aorta ve sağ ventrikülden çıkan pulmoner arter aracılığıyla terk eder. Bu damarların her biri ortalama 2.5 cm çapındadır. Pulmoner arterden dallanan daha küçük çaptaki pulmoner arterler kanı akciğerlere taşır. Sistemik dolaşımı sağlayacak olan diğer damarlar ise aorttan dallanarak tüm vücuda yayılır. Bu damarlar dokuların içinde arteriyollere, arteriyoller de kapillerlere dönüşür. Şekil 2.3'de koroner dolaşım şematik olarak gösterilmiştir.

Vücudun yaşamsal olayları kapiller düzeyde gerçekleşir. Bu kapillerlerin çapı tek bir eritrositin geçebileceği kadar dardır. Oksijenin alımı ve atık maddelerin uzaklaştırılması gibi tüm gaz ve kimyasal aktiviteler dokulardaki kapiller difüzyonu sayesinde olur (8).

Kan damarlarının basınçtaki değişikliklere dayanıklı ve doku ile organların hareketi altında esnek olması gerekmektedir. Bahsedilen bu damarların farklı görevleri yerine getirdikleri ve kalbe farklı mesafelerde buldukları göz önüne alındığında bu damarların değişik yapılara sahip oldukları anlaşılabilir. En kalın damarlar, kalın ve sert bir bağ dokusu ile düz kas hücrelerinin oluşturduğu katmanlardan meydana gelmiş arterler ve venlerdir. Damar duvarındaki düz kas hücre tabakası ve bağ dokusu damarın işlevine göre farklı çaplar oluştursa da en iç

yüzeyi döşeyen tek sıralı endotel tabakası, işlevi ne olursa olsun bütün damarlarda bulunur.



Şekil 2.3. Koroner dolaşım (22).

### 2.3.1. Kan Damarlarının Anatomisi

Fonksiyonel anatomi açısından kan damarlarını endotel ve damar düz kas hücreleri olarak iki tip hücre oluşturur. Damarın iç yüzeyini oluşturan endotel hücrelerinin meydana getirdiği tek sıralı tabaka "endotelyum" adını alır. Organizmayı oluşturan hücrelerin solunumu, beslenmesi ve metabolit ihtiyaçlarını karşılayan kan damarlarının kimyasal ve fiziksel uyarılara vermiş oldukları cevap, damarın tonusu ve geçirgenliği değiştirilerek sağlanır (23).

Hem arterler hem venler üç tabakadan meydana gelmektedir. Bunlar; tunika intima, tunika media, tunika eksterna olarak adlandırılırlar.

### **2.3.1.1. Tunika intima (iç tabaka)**

Damarın en içte bulunan ve tek sıra halinde dizilmiş endotelyum adını alan epitel doku, endotelyumun üzerine oturduğu bazal lamina ve konumlandığı bağ dokusuyla beraber oluşturduğu tabakadır. Bu tabaka arterlerde elastik fiberlerden oluşan görece daha kalın olan ve internal elastik membran adı verilen elastik bir tabakayla tunika media'ya bağlanır (9).

Endotel hücreleri, vücutta bulunan bütün damarların i yüzeyini kaplar ve kan akışını kontrol eder. Bir embriyo incelendiğinde arterlerin ve venlerin sadece endotel ve bazal lamina içeren hücrelerin oluşturduğu küçük damarlardan geliştiği görülmüştür. Perisitler, bağ dokusu ve düz kas hücreleri, endotel hücrelerinden gelen sinyallere (zellikle platelet kaynaklı büyüme faktörü beta, PDGF-β) göre oluşuma dahil olurlar. Bu sinyalin yokluğunda perisit eksikliği ve buna bağlı olarak mikroanevrizmalar gelişir. Bu durum da perisitler ve endotel hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimin önemini vurgular (24). Damar olgunlaştıktan sonra endotel hücrelerinden gelen sinyallerle damarın işlevi ve yapısı düzenlenmeye başlanır. Bu hücrelerin yüzeylerinde kan akımından kaynaklanan sürtünmeyi algılayan mikroalmalar bulunur. Bu bilgilerin evre hücrelere iletilmesiyle kan akımına göre damarın çap ve kalınlıkları uyarlanır, düz kas hücrelerinin kasılması ve genişlemesi için çeşitli moleküller salgılanır (24).

### **2.3.1.2. Tunika media (orta tabaka)**

Orta tabaka, sıkı düz kas dokusu ve gevşek bağ dokusundan meydana gelmiştir. Kollajen fiberleri orta tabakayı i ve dış tabakaya bağlar. Dış tabakadan "eksternal elastik membran" adı verilen ince bir elastin bandıyla ayrılır. Geniş damarlarda düz kas hücreleri boylu boyunca uzanmıştır. Damarın apı bu hücreler kasıldığında daralır, gevşediğinde genişler. Çeşitli oranlarda elastin, retiküler fiberler ve proteoglikanlar düz kas hücrelerinin aralarında konumlanmıştır. Arterlerde bu tabaka daha kalındır. Orta tabakanın ekstraselüler yapısı düz kas hücreleri tarafından sentezlenir. Bu tabakada fibroblast hücreleri bulunmaz (9).

Elastin, lameller ya da aralarında geçişler bulunan tabakalar halinde düz kas hücrelerinin arasına dizilmiştir. Lamellerin aralarında bulunan açıklıklarla arter duvarına difüzyon kolaylaşır. Bu lameller yaşa ve kan basıncına bağlı olarak değişir. Bir yetişkinde 40-70 lamel bulunurken; yüksek tansiyon hastalarında bu duvar kalınlığı ve lamel sayısında artış gözlenir.

### **2.3.1.3. Tunika eksterna/adventisya (dış tabaka)**

Damarın en dış kısmında bulunan ve bağ dokudan oluşmuş bir tabakadır. Arterlerde bu tabakada kollajen ve elastin fiberleri bulunurken venlerde elastik fiberler ile düz kas hücrelerinden oluşmuştur. Bu tabaka damarın dokularla kaynaşmasını sağlayarak damarı stabilize eder. Dış tabaka arterlerde görece daha inceyken venlerde ve venüllerde daha kalındır. Geniş çapa sahip damarların beslenmesini sağlayan ayrı damar sistemleri vardır, bunlara *vaso vasorum* (damarların damarı) adı verilir. Bunun yanında bu tabakada *nevri vascularis* adı verilen otonom sinir ağları vardır. Bu ağlar düz kas hücrelerinin kasılmasında elektriksel uyarıların iletimini sağlar (9).

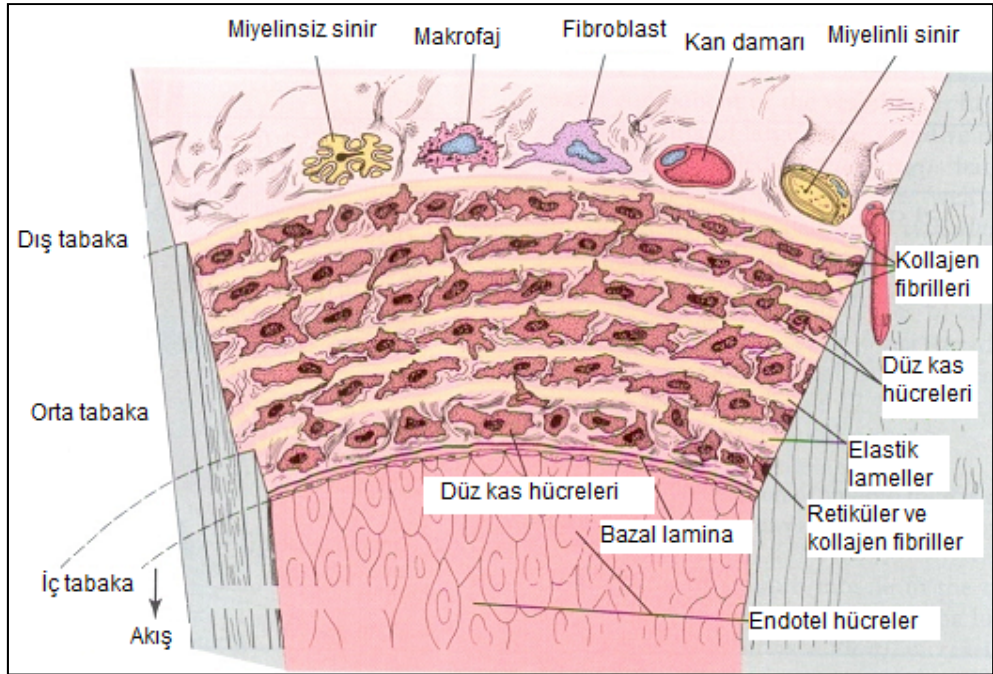
Bu tabakalar damarların basınç ve hacim değişikliklerinde damara dayanıklılık sağlar. Düz kas hücrelerinin kasıldığı ve damar lümeninin daralmasıyla sonuçlanan durumda sistemik kan basıncı artar (vazokonstrüksiyon). Bu hücreler gevşediğinde damar lümeni genişler ve sistemik kan basıncı azalır (vazodilasyon).

### **2.3.1.4. Arterler**

Elastik bir yapıya sahip olmaları nedeniyle arterler kan basıncındaki değişikliklere daha iyi cevap verebilirler. Orta tabakadaki düz kasların ilgili biyokimyasallara cevap vererek kasılması ve gevşemesiyle kan kalpten yüksek basınçla alınır ve diğer damar aracılığıyla dokulara iletilir. Arterler; elastik arterler, müküler arterler ve arterioller olmak üzere kendi aralarında üçe ayrılır.

### Elastik arterler

Çapları 2.5 cm'ye kadar ulaşan, yüksek hacimdeki kanı taşıyan ve orta tabakalarında çok sayıda elastik fiber bulunduran büyük damarlardır. Aorta, pulmoner arter ve iliak arterler en bilinen örneklerdendir. Bu damarlar kanı kalpten sistemik ve pulmoner dolaşıma iletirler. Kalpten yüksek basınçla alınan kanı taşıyabilmek için damar duvarları ve lümen çapları diğer damarlarla kıyaslandığında oldukça geniştir ve elastin fiberleri açısından zengindir. Bir damarın elastik olması, kan basıncında meydana gelen ani değişikliklerin dengelenmesini sağlar. Böylelikle kan akışı arteriollere kesintisiz olarak ulaşır.

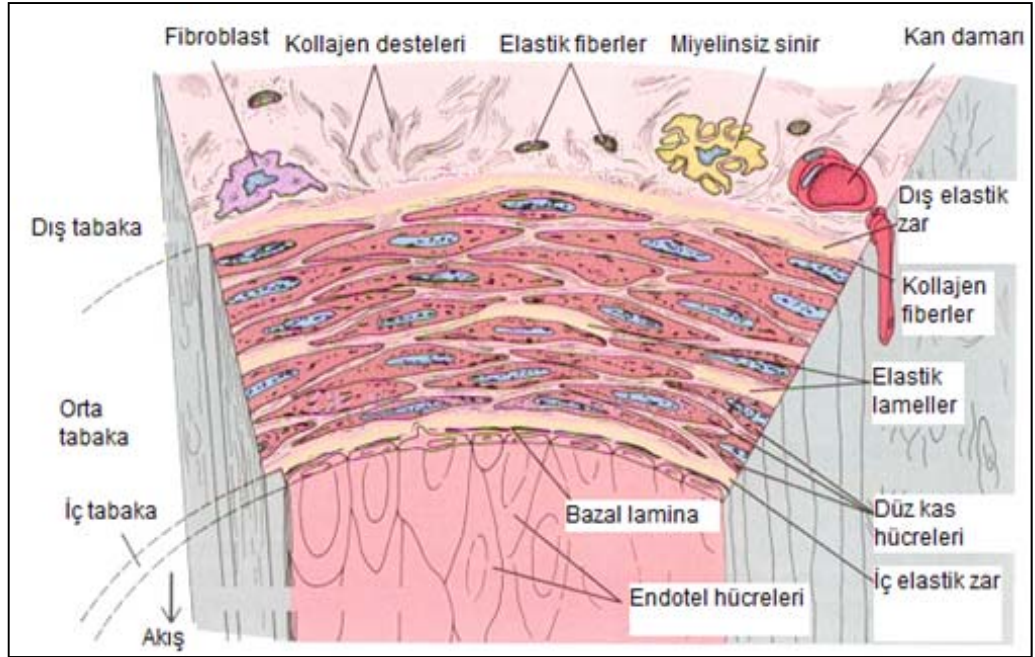


Şekil 2.4. Elastik arter (9).

### Müsküler arterler

Elastik ve geniş çapa sahip müsküler arterler arasında keskin bir farktan söz etmek zordur. Bazı damarlar iki yapıya da benzer özelliklere sahip olabilir. Genel olarak, kanı iskelet kasları ve iç organlara taşıyan, orta tabakada elastik fiberlerden ziyade düz kas tabakasını barındıran ve internal elastik membranın daha belirgin olduğu orta boydaki arterler müsküler arterlerdir. Bu damarlarda temel ekstraselüler matriks elemanı da kollajendir.

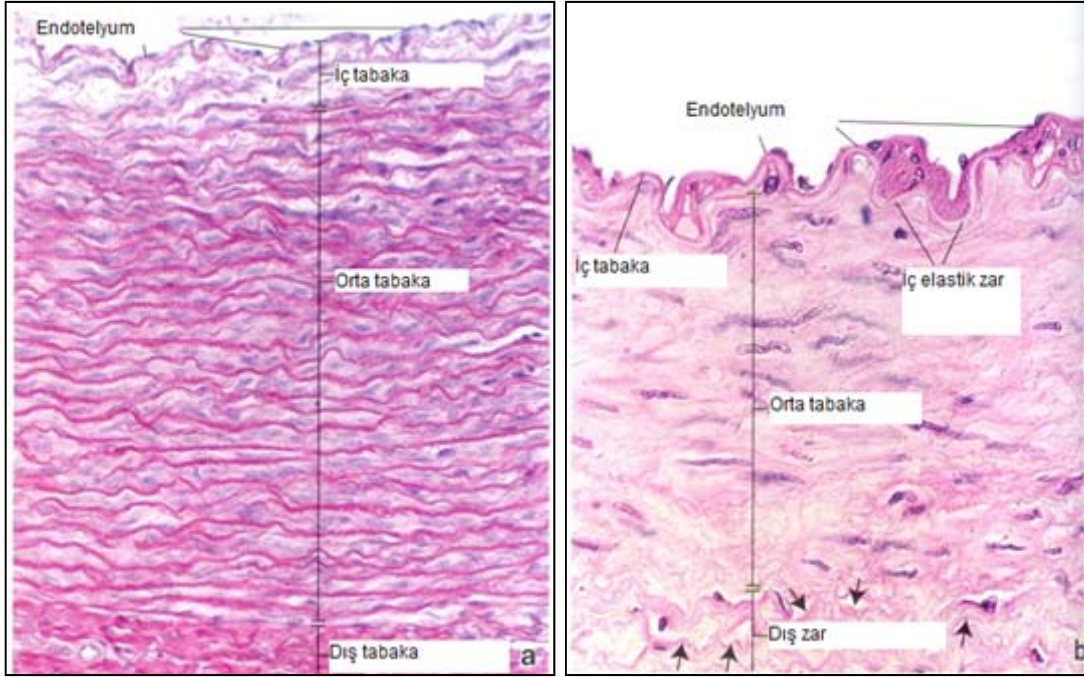
Müsküler arterlerin çapları 0.1-10 mm arasında değişir. Koldaki brakial arterler ve karındaki mezenterik arterler örnek olarak verilebilir. Bu tipteki arterler basınç noktalarında ve gerektiğinde kan akışını durdurmak (kanamayı kontrol altına almak) için önem taşımaktadırlar. Damar kalınlığı yaşla beraber artar (9).



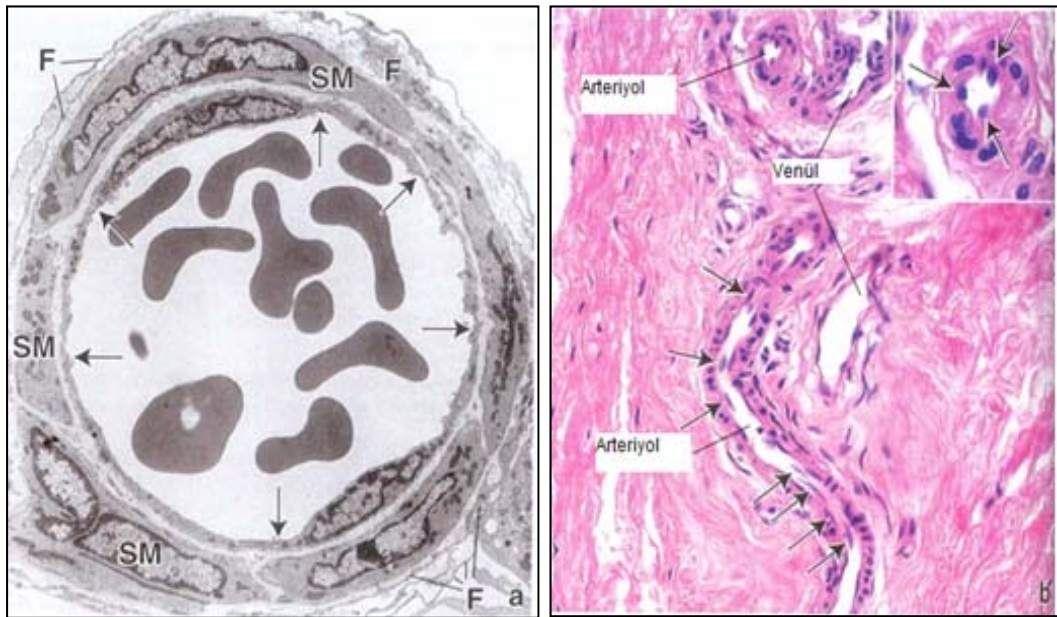
Şekil 2.5. Müsküler arter (9).

### Arterioller

İç çapları 10-100  $\mu\text{m}$  olan arteriollerin dış tabakaları yok gibidir; orta tabakaları da görece daha büyük çapta olanlarda 1-2 sıra düz kas hücre tabakasından meydana gelmiştir. Daha küçük çaptakilerinde ise düz kaslar bir tabaka oluşturmadan bulunmaktadır. Endotel hücreleri diğer damarlarda olduğu gibidir, yalnız ekstraselüler matriks miktarları daha düşük olabilir. Bu damarlar kılcal yataklarla ilişki halindedirler. Düz kas hücrelerinin kasılması ile kılcallara giden kan miktarı azalır ya da oksijen ihtiyacı arttığında bu damarlar gevşer, çapları artar ve kan akışı sağlanır.



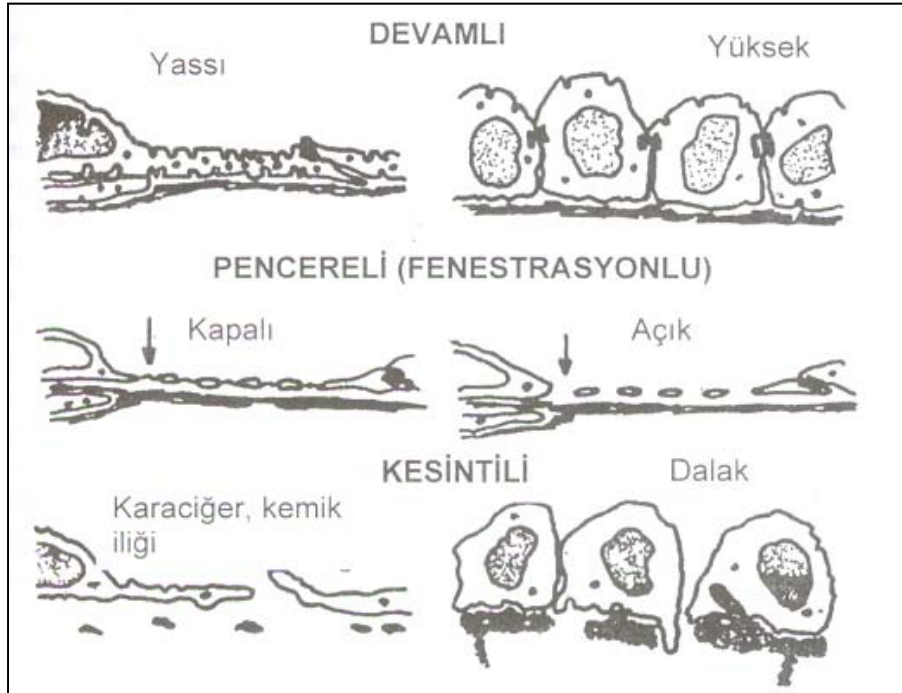
**Şekil 2.6.** Elastik ve müsküler atar damarların kesitleri (a, b). Elastik atar damarlarda elastin ve kollajen fiberlerinin varlığı belirgindir (9).



**Şekil 2.7** a) Bir arteriyolün çapraz kesitinin elektron mikrografı. Oklarla gösterişlen yerler endotel hücrelerinin bağlantı yerleridir. F: Fibroblast, SM: Düz kas hücreleri, x6000. B) Dermisteki bir arteriyol ve venülün fotomikrografı. Oklarla gösterilen uzamış hücre çekirdekleri endotellere, daha büyük büyütmede gösterilen çekirdekleri ise düz kas hücrelerine aittir x320, x600 (9).

### 2.3.1.5. Kapillerler

Daha önce de bahsedildiği gibi kapillerler vücudun yaşamsal olaylarının (yani gazların, metabolitlerin ve atık maddelerin) taşınmasının sağlandığı damarlardır. Tek sıralı endotel hücrelerden ve bu hücrelerin bazal laminalarından ibaret bir yapıya sahiplerdir. Orta ve dış tabakaları yoktur. Endotel hücrelerinden ibaret çeperlerinin dışında 0.025 mm kalınlığında bir bazal membran bulunur (22). Çapları ortalama neredeyse bir eritrositin boyutu kadar; yaklaşık 8  $\mu\text{m}$ 'dir. Eritrositler kendilerini katlamak suretiyle bu kılcalların içinde yolculuk edebilir. Eritrositler lümeni doldurarak metabolitlerin ve gazların dış dokuya olan difüzyonunu bir ölçüde sınırlar. Endoteller buldukları dokuya göre farklı yapılarda olabilir (25). Kapillerler de buna göre sürekli, pencereli ve sinüzoidal kapillerler olmak üzere gruplandırılır. Sürekli kapillerlerde endotel hücreleri çok sıkı bir yapıdadır ve madde alışverişi çok seçici olarak difüzyonla gerçekleşir. Pencereli kapillerlerde endoteller arasında açıklıklar bulunur. Bu açıklıklardan doku arası sıvıya su ve peptid molekülleri gibi besin maddelerinin alışverişi sağlanır. Sinüzoidlerde bu açıklıklar eritrositlerin bile geçebileceği kadar artar (22).



**Şekil 2.8.** Kılcalların sınıflandırılması (22).

### 2.3.1.6. Venler

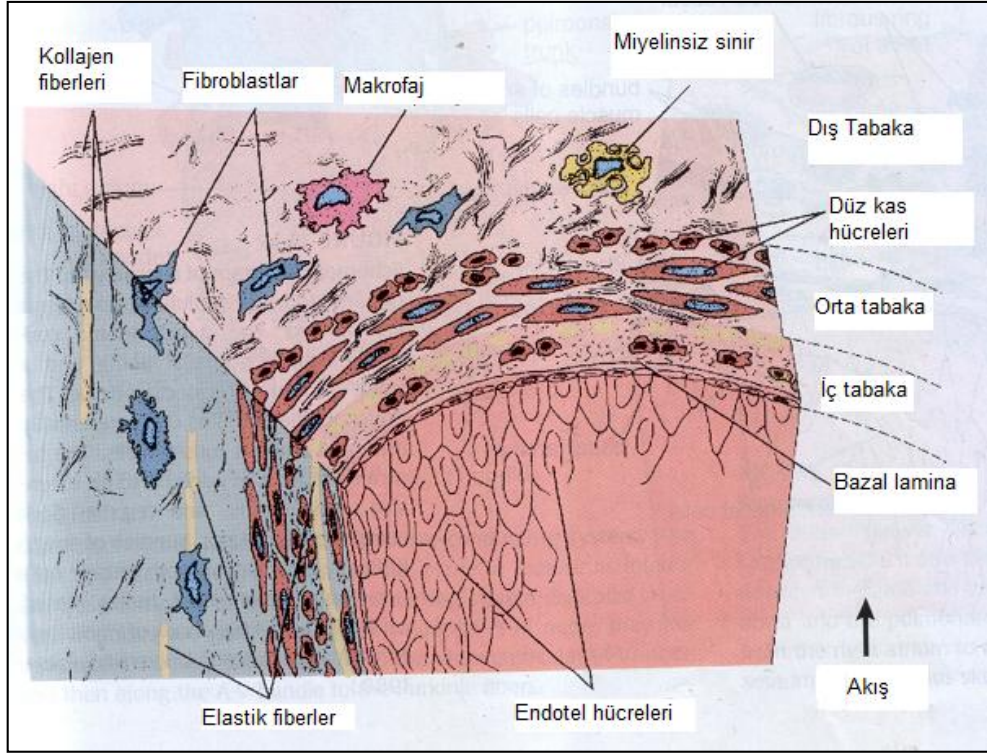
Venler doku ve organlardan kanı toplayıp tekrar kalbe götüren, kan basıncı daha düşük olduğu için duvar kalınlıkları arterlere nazaran daha ince olan damarlardır. Fakat duvarları ince de olsa, çapları arterlerden daha geniş olabilir. Toplardamarlar da üç tabakadan meydana gelmişlerdir fakat bu tabakalarda atar damarlarda olduğu gibi keskin bir sınır yoktur. Toplardamarlar da kendi aralarında üçe ayrılır:

#### **Küçük çaplı venler/venüller**

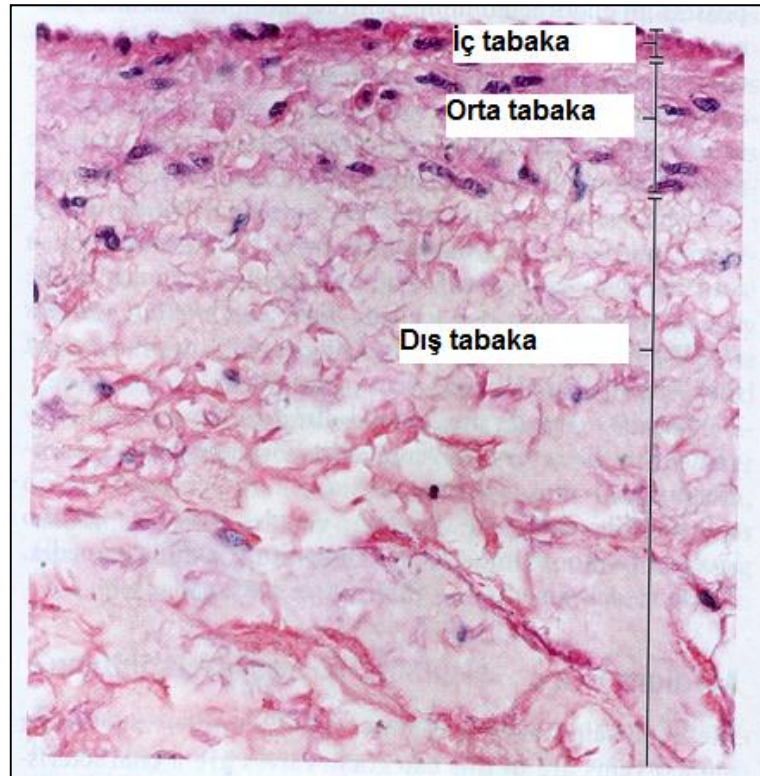
0.2 mm ya da daha geniş venüller kapillerlerden kanı alarak daha büyük çaptaki venlere iletimlerini sağlarlar. Tek sıralı endotel hücreleri ve bazal laminalarından meydana gelmiştir ve perisitlerle komşudurlar. Postkapiller venüllerin endotel hücreleri histamin ve serotonin gibi vazoaaktif ajanların salgılanması açısından önem taşırlar. Özellikle lenf sisteminde olmak üzere lenfositlerin göç ederek ilgili dokulara taşınması bu sayede gerçekleşir. Postkapiller venüllerden sonra müköler venüller (çapları ~ 1mm) gelir. Bu venüllerin bir ya da iki sıradan oluşan bir orta tabakası ve çok ince bir dış tabakası bulunur (9).

#### **Orta çaplı venler**

Yarıçaplar 10 mm'ye kadar çıkabilir. Toplardamarların çoğu bu gruptandır. Bu damarlarda kanın geri akışını engelleyen kapakçıklar bulunur. Bu kapakçıklar kanın akış yönüne doğrudur ve kanın o yönde akmasını sağlar. İç tabakalarında tek sıralı bir endotelyum, atar damarlara göre daha ince ve halkasal dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan bir orta tabaka ile orta tabakalarına göre daha kalın olan bir dış tabakaya sahiplerdir (9).



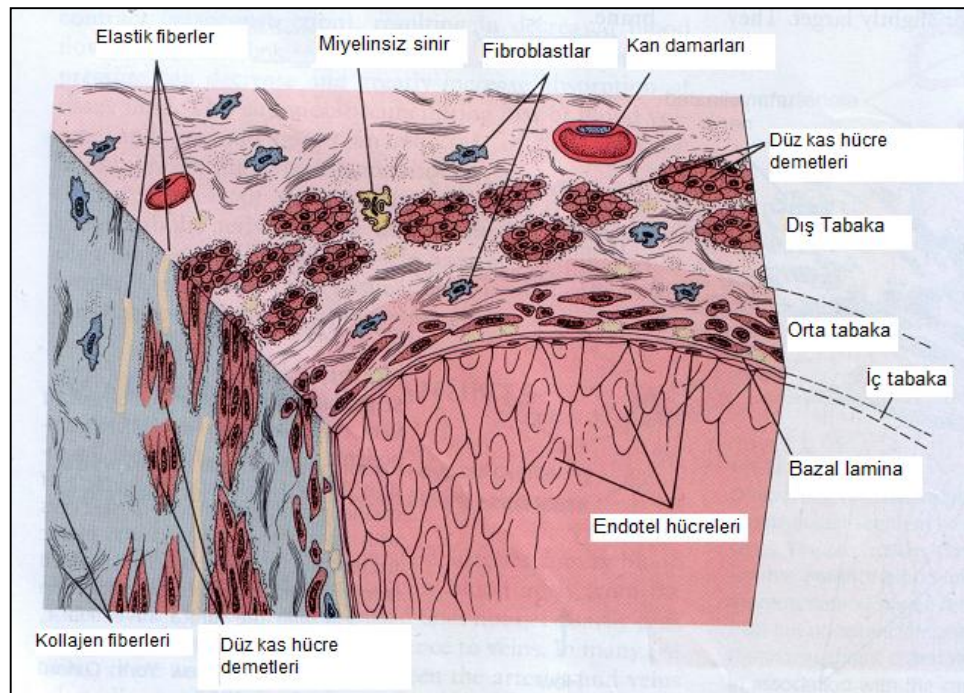
Şekil 2.9. Orta çaplı ven (9).



Şekil 2.10. Orta çaplı bir venin boyuna kesidi (9).

### Geniş çaplı venler

Çapları 10 mm'den geniştir ve iç tabakalarında da bir miktar düz kas hücreleri bulunmasından dolayı iç ve orta tabaka arasındaki sınır keskin değildir. Halkasal düz kas hücrelerinin oluşturduğu orta tabaka kısmen daha incedir. Bu damarlarda dış tabaka çok kalındır ve bu tabakada da uzunlamasına yerleşmiş düz kas hücreleri elastik ve kollajen fiberlerle birlikte yer alır (9).



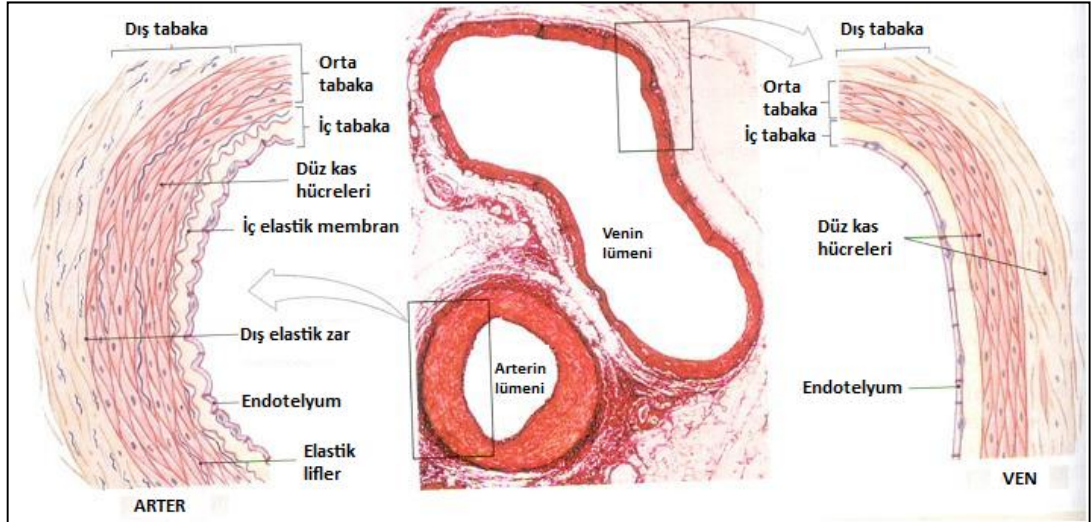
Şekil 2.11. Geniş çaplı ven (9).

Tablo 2.1. Kan damarlarının boyutlarının karşılaştırılması (10).

Tip	Çap (mm)	Duvar kalınlığı (mm)	Uzunluk (cm)	İç basınç (mmHg)
Aorta	25	2	40	100
Arter	4	0.8	15	90
Arteriol	0.3	0.02	0.2	60
Kapiler	0.008	0.001	0.075	30
Venül	0.02	0.002	0.2	20
Ven	5	0.5	15	15
Geniş ven	15	0.8	20	10
Vena cava	30	1.5	40	10

### 2.3.1.7. Arter ve venlerin farkları

Kesitsel olarak bakıldığında arterler ve venlerin tabakalanmalarında bazı farklılıklar izlenir. Bunlardan biri çoğunlukla arterlerin duvar kalınlıklarının venlerden daha kalın olmasıdır. Bunu sağlayan arterlerdeki orta tabakanın daha fazla düz kas ve elastik fiber içermesidir. Bu elastik fiberler, damar kan basıncına maruz kalmadığı sürece lümeni kasarlar ve kesit alındığında arterlerin çapları daha küçük görünür. Venlerde ise lümen, kesit alındığında diriliğini kaybeder ve daha geniş görünür. Arterlerdeki endotelyum kasılmadığı için arter kasılınca endotelyum kıvrımlı bir görünüm alır. Venlerde ise bu şekilde bir görünüm gözlenmez. Arterler daha dirençlidir. Venlerin aksine üzerlerine bir baskı uygulandığında elastikiyet gösterir ve bu baskı kalktığında eski şekline döner ve silindirik yapısını kaybetmez. Venlerde arterlerden farklı olarak kapillerden gelen kanın geri akmasını engellemek için kapakçık benzeri yapılar bulunur.



Şekil 2.12. Arter ve toplar damarların karşılaştırılması (8).

### 2.3.1.8. Endotelyum ve damarlanma

Endotelyum, 2.3.1.1. bölümünde de belirtildiği üzere kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen tek sıralı ve poligonal morfolojideki hücre tabakasıdır. Genellikle durağan evrede bulunan bu tabaka endometriyum ve “corpus luteum” gibi

dokularda düzenli bir döngü içinde ve zarar gören dokunun iyileştirilmesi (rejenerasyon) için proliferatif evreye geçer (26). Endotel hücreleri sadece dokuyu yenilemekle kalmaz, aynı zamanda yeni kan damarlarının oluşumunu da sağlar. Erişkinlerde yeni damarların oluşumu, varolan küçük damarlardan filizlenen kılcal damarlardan köken alır ve bu damarlanma, damarlanmaya özgül sinyallere yanıt olarak gerçekleşir. Endoteller damarların kenarından uzun yalancı ayaklar uzatıp büyüyerek bir tüp şeklinde kılcal damar oluşmasına öncülük eder. Bu uzantı başka bir kılcalla birleşerek arada kan akımı sağlar. Arter ve ven hücrelerinin yüzeyinde farklı proteinlerin bulunması sebebiyle gönderilen uygun sinyale göre damar ağı oluşturulur (24).

Hem normal gelişim hem de doku onarımında yeni kılcal dallanmaların gerçekleştirilebilmesi endotellerin PDGF ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) uyarılarına verdiği tepkilerle sağlanır. Bunun yanında dokularda oksijen ihtiyacı duyulduğu zaman hipoksi ile uyarılan faktör 1 (HIF-1) adlı bir proteinin hücre içi derişiminde artış göstermesi VEGF'nin salgılanmasını tetikler, böylece dokunun içinden dışarıya difüzlenir ve yakındaki endotel üzerine etki eder. Bunun sonunda da endoteller ilgili sinyale doğru giderek ve sayılarını arttırarak yeni kılcalları oluşturur. HIF-1 derişimi, oksijen ihtiyacı giderilince azalır ve VEGF üretimi durdurularak damarlanma son bulur (24).

### **2.3.1.9. Endotelyum ve biyokimyasal düzenlemeler**

Endotel hücreleri 10-15  $\mu\text{m}$  genişliğinde ve 20-25  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır. Normal bir hücrede bulunan organellerin yanında "Weibel-Palade Body" adı verilen özgül organeller bulunur. Bir zarın içinde bulunan tübüllerden oluşmuş bu yapı von Willebrand faktörünün salgılandığı yerdir (27). Damarın iç yüzeyinde üzerindeki mikrokıvrımlar sayesinde çok geniş bir alan kapladığı için hem plazmayla hem de kılcallarda olduğu gibi pek çok farklı dokuyla etkili bir şekilde ilişki halindedir (27). Endotel hücrelerinin meydana getirdiği dokunun gaz geçirgenliği çok yüksekken sıvı geçirgenliği daha azdır. Solunum gazları, su, glukoz, yağ asitleri, aminoasitler

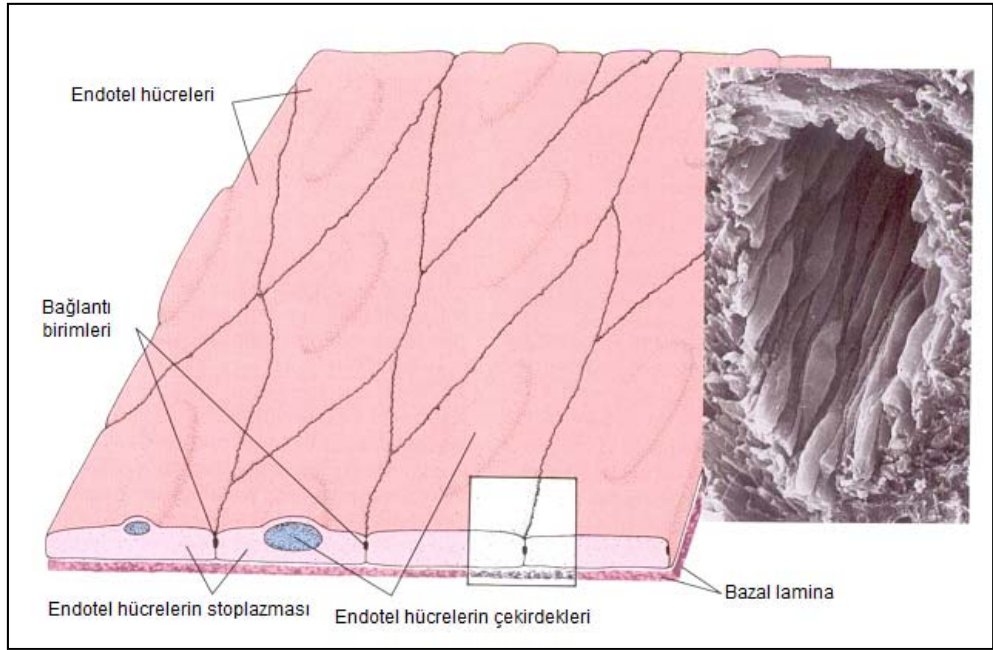
arterlerin endotellerinden geçerken, makromoleküller hücrelerarası taşıyıcı veziküllerle taşınırlar (23).

Endotel hücrelerinde de aktin ve miyozin filamentleri bulunsa da kasılma yönünden çok güçlü hücreler değildir. Fakat hücresel geçişin (permeabilizasyonun) sağlanması, kanın stres yaratan etkisine karşı konulması ve damar yapımında (anijiyogenez) hücrelerin göçünün sağlanması açısından önem taşımaktadırlar (27).

Endotel hücreleri, genel özelliklerinin dışında buldukları yere göre özelleşmiş bazı görevlere sahip olabilirler. Bunu sağlayan özelliklerin başında hücrelerin birbiriyle farklı bağlantılar kurması gelir. Birbirleriyle kurmuş oldukları bu bağlantılar sıkı bağlantı birimleri (tight junctions) ve aralıklı bağlantı birimleri (gap junctions) olarak adlandırılır. Sıkı bağlantılar geçirgenlik kontrolünün sağlanmasında önemliyken, aralıklı bağlantı birimleri sayesinde de hücreler arası etkileşimler gerçekleşir (23). Beyin endotelleri sıkı bağlantılara sahip daha seçici bir endotelyumla damar endotelyumlardan ayrıldığı gibi, damar endotelyumu da venüllerde daha gevşek, arteriyollerde de görece daha sıkı bağlantılar içermesi bakımından birbirinden ayrı özelliklere sahip olabilir. Bu hücreler kan akışının stresine doğrudan maruz kaldıkları için üzerlerinde yer aldıkları düz kas hücrelerinin bu akıma tepki vermelerini sağlamak amacıyla önemli moleküller salgırlar (27). Endotel hücrelerinin işlevlerini aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür:

- Kan akışında pıhtılaşmanın engellendiği bir yüzey oluşturmak,
- Pıhtılaşmanın (koagülasyonun) düzenlenmesi (fibrin oluşumu, fibrinolisizin gerçekleşmesi),
- T-lenfositlerine antijenlerin tanıtılması,
- Kemotaktik olarak sitokinlerin salımı,
- Lökositlerin tümör hücrelerine gönderilmesi,
- Düz kas ve perisitlerin çoğalmasının kontrol altında tutulması ve büyüme faktörlerinin salgılanması,
- Vasküler tonusun ayarlanması,
- Patojenlere karşı koruma,

- Yeni kan damarlarının yapımında görev almaları,
- Enzimatik aktiviteler,
- Mikrodolaşımda perfüzyonun ve geçirgenliğin düzenlenmesi,
- Otakoidlerin salgılanması ve bunlara cevap oluşturulması,
- Plazmadan hücrelerarası boşluğa makromoleküllerin alınımında özel zar reseptörleri, veziküller ve porlar kullanılması.



**Şekil 2.13.** Endotelyumun şekilsel ve elektron mikrograf görünümü (9).

### Prokoagülanlar

Endotel hücrelerinin en önemli görevlerinden biri çeşitli molekülleri salgılayarak kan hücrelerinin damar duvarına yapışmasını ve pıhtı oluşturmasını engellemektir. Bu moleküllerden biri kuvvetli bir trombosit antiagreganı ve vazodilatörü olan prostasiklin ( $PGI_2$ )'dir. Histamin, bradikinin, HDL, tripsin, trombin, hipoksi ve anjiyotensin II'nin salgılanmasını uyaran prostasiklinler, trombositlerin zarındaki reseptörlere bağlanarak adenilat siklazı uyarır ve trombositler cAMP seviyesini yükseltir. Bunun sonucunda pıhtı (trombus) oluşumu engellenir (23).

**Tablo 2.2.** Endotel hücrelerden sentezlenen ve salgılanan biyoaktif moleküller (23)

<b>VAZOAKTİF PROTEİNLER</b>	<b>BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE SİTOKİNLER</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotel kaynaklı gevşetici faktör [(EDRF (NO))]</li> <li>• Endotelin</li> <li>• Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)</li> <li>• Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör</li> <li>• Platelet aktive edici faktör (PAF)</li> <li>• Interlökin 1, 6, 8.</li> <li>• Trombosit büyüme faktörü (TGF)</li> </ul>
<b>PROKOAGÜLANLAR</b>	<b>ANTİTROMBOTİK VE ANTİKOAGÜLAN FAKTÖRLER</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasminojen aktivatör inhibitörü (PAI, PAI<sub>2</sub>, PAI<sub>3</sub> ve Proteaz neksin)</li> <li>• Fibronektin</li> <li>• F IX bağlayıcı protein</li> <li>• FV ve FXII aktivatörü</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doku plasminojen aktivatörü (t-PA)</li> <li>• Trombomodulin</li> <li>• Protein-S</li> <li>• EDRF (NO)</li> <li>• Ekstrinsik sistem inhibitörü (TTPAI)</li> <li>• Antitrombin III</li> <li>• PGI-2</li> </ul>

Her dokuda olduğu gibi, endotelyum da immünolojik, oksidatif ve mekanik nedenlerle meydana gelen strese dolay kolayca zarar görebilir (28). Endotel hücrelerinin sıkı ve düzgün yapısı bozulup hücreler yer yer dökülmeye başlarsa çok sayıda vasküler cevabın biyokimyasal düzenlenmesinde bozukluklar görülür (1). Örneğin nontrombojenik yüzeyin hasar görerek ortadan kalkması, subendoteldeki kollajen liflerin faktör XII'yi aktive etmesi ve faktör XI'in aktif trombosit yüzeyinde aktive olmasıyla pıhtılaşma başlar. Endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan heparin/heparan sülfat tabakası, antitrombin III'ün kofaktörüdür. Ayrıca hücre yüzeylerinde plasminojen ve tPA bağlayan bölgeleri vardır, böylelikle plasminojen plazmine çevrilir ve plazminin dolaşımdaki plasminojen inhibitörlerinden kurtularak etkilerinin lokal olmasını sağlarlar (23).

### **Vazoaktif proteinler**

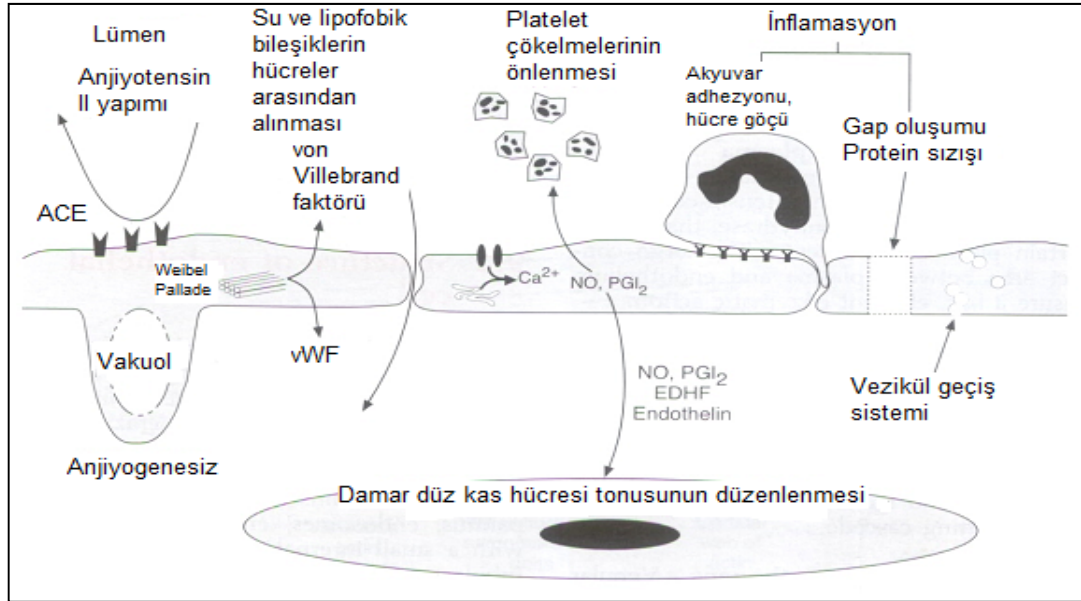
1980'li yıllarda, damarlarda gevşemeyi sağlayan ve endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDGF) adı verilen bir molekül keşfedilmiştir (23). Bazı kaynaklarda sadece nitrik oksit (NO) olarak da verilen bu molekülün aslında NO ve ilgili bileşikleri içerdiği bilinmektedir. NO, bunlardan en önemlisidir.

Damarı gevşetici faktörlerin varlığı damarın kasılmasını sağlayan faktörlerin olabileceği sorusunu doğurmuş ve 1988'de vazokonstrüktör bir molekül olan endotelin (ET) keşfedilmiştir (29). İnsanda bilinen 3 çeşit endotelin molekülü bulunmaktadır (ET-1, ET-2, ET-3). ET-1, endotel hücreleri tarafından sürtünme gerimi, pıhtı ve TGF- $\beta$  gibi sitokinlere yanıt olarak salınmakta ve hipertansiyon ve damar hasarıyla ilgili durumlarda dolaşımdaki düzeyleri artmaktadır (30). ET'ler en güçlü ve etkisi en uzun süren vazokonstrüktörlerdir. Damar düz kas hücreleri üzerinde mitojenik özelliğe sahiptirler (23).

Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) bir prostaglandin molekülüdür. Damar düz kas hücreleri için vazodilatör görevini görür ve oluşmuş pıhtıların endotel yüzeyine tutunmalarını engeller. Hücreler içindeki cAMP miktarını arttırarak trombosit kümelerini inhibe eder (23).

Kan damarları ısı, gerim, basınç gibi fiziksel ve hormon, nörotransmitter gibi kimyasal uyarılara karşı tonuslarını ve geçirgenliklerini ayarlarlar ve bu şekilde beslenme, solunum ve metabolik gereksinimlerini düzenlerler (30).

Endotel hücreleri, PGI<sub>2</sub>, NO ve tPA gibi antitrombotik ve fibrinolitik çeşitli faktörler salgılayarak pıhtı oluşumunu engellerler (26). Ayrıca endotel ve düz kas hücreleri arasında elektrik yüklerinin, metabolitlerin ve PGI<sub>2</sub>, anjiyotesin ve ET gibi moleküllerin geçişlerini sağlayan bağlantılar vardır, bu nedenle endotel ve düz kas hücreleri sürekli bir ilişki halindedirler (31). Bu hücrelerin işlevini bozan etmenler; NO sentezinin azalması, dolaşan düşük yoğunluktaki lipoproteinlerin (LDL) o bölgedeki oksidasyonu ve bunların damar duvarına giriş yapması olarak tanımlanabilir (32).



**Şekil 2.14.** Bir endotel hüresinin çoklu işlevlerini gösteren şematik bir çizim. NO: Nitrik oksit, PGI<sub>2</sub>:Prostasiklin, EDHF:Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör, ACE: Anjiyotensin I dönüştürücü enzim, vWF: von Willebrand faktör (27).

Vasküler endotelium ise damarın uzun eksenini boyunca bir bazal lamina üzerine tek sıra halinde yer alır. Endotel hücrelerinin *in vitro*'da çalışılarak damarlardaki patofizyolojik olayların çözülmesi için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar her ne kadar bizlere pek çok faydalı bilgi sağlamış olsa da *in vivo*'daki durumlarından farklı bazı koşullarda olduklarını da göz önünde bulundurmak gerekir. Örneğin *in vivo*'da bulunan kan akışı, çeşitli biyokimyasal sinyaller gibi bazı karakteristiklere maruz kalmayan endoteller özgül bazı özelliklerini yitirebilirler ve *in vitro*'da, *in vivo*'da olduğundan daha fazla büyüme oranı gösterirler. Bunun yanında endotellerin çalışılmasının ilginç sonuçları da olmuştur. Furchgott, Ignarro ve Murad 1998 yılında endotellerden salgılanan NO'nun kardiyovasküler sistemde etkili olduğunu keşfetmeleri nedeniyle 1998 yılında fizyoloji ve tıp alanında Nobel ödülü kazanmışlardır (33). Endoteliumdan salgılanan ve gevşemeyi sağlayan NO'un bulunmasından sonra bu hücrelerin kasılmayı da etkileyen faktörlere sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu faktörler endotelin (ET-1), tromboksan A<sub>2</sub> ve prostaglandin H<sub>2</sub> gibi vazokonstriktör moleküllerdir (28). ET-1'in salgılanma miktarı çoksa kasılmayı sağladığı keşfedilmiştir (34). Endotel hücrelerinin kaybı plateletlerin ve beyaz kan

hücrelerinin kaybına, zaman içinde de intimal hiperplaziye yol açar. Bu gözlemlerden yola çıkılarak endotelyumun vasküler yapıyı düzende tuttuğu ve düz kas hücrelerinin aşırı çoğalmasını engellediği yorumlanabilir çünkü vasküler yapı asıl olarak düz kas hücrelerinin büyümesiyle ilişkilidir. Endotel hücreleri bu süreci doğrudan ya da dolaylı olarak etkilerler (28). Endotel hücreleri PGI<sub>2</sub> ve NO salgılayarak platelet adhezyonunu engellerler. Eğer endotelyum bir şekilde hasara uğrar ya da çıkarılırsa plateletler yüzeye yapışır ve salgılanan PDGF nedeniyle düz kas hücreleri sayıca artmaya ve göç etmeye başlarlar (35). Bu bilgiler ışığında *in vitro*'da üretilen bir vasküler damar için iyi bir endotelyumun oluşturulması, greftin fonksiyonelliği için gerekli olan temel şartlardan birisidir.

İnsan arter endotel hücrelerinden saflaştırılan ekstraselüler proteoglikanların insan VSMC'lerinin proliferasyonu üzerinde etkili olup olmadığıyla ilgili yapılan bir çalışmada perlekan, bazal membran HS, CS'in VSMC'lerin proliferasyonunu engellemediği gösterilmiştir. Buna göre EC'lerin SMC'lerin proliferasyonu üzerindeki etkisinin doğrudan ve üremeyi engelleyici bir molekül salgılayarak olmadığı fakat intimal hiperplaziye plazmada aktive edici faktörlerden bir bariyer sağlayarak dolaylı yoldan engellediği yönündeki bir hipotez de öne sürülmüştür (36). Fakat sadece kokültür ortamı oluşturmanın gerçek bir damarın fizyolojisini taklit etmediği, bu nedenle dinamik bir sistem içerisinde damar yapısına dair daha verimli bilgiler edinilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

#### **2.4. Vasküler Doku Mühendisliğindeki Gelişmeler**

Giriş ve 2. bölümde bahsedildiği gibi, cerrahi uygulamaların ve sentetik greftlerin yetersiz kaldığı durumlara alternatif olarak üretilen vasküler greftlerin biyolojik ve doğal özelliklerde üretilmesi kaçınılmaz olmuştur. İnterdisipliner bir alan olan doku mühendisliğinde vasküler doku mühendisliği çok önemli bir yer tutmaktadır.

İdeal bir vasküler greftin tek sıra endotel hücrelerden, iyi differensiyasyon olmuş düz kas hücrelerine sahip, sistematik ve kan basıncına ve sutür gerilmesine dayanıklı olması, inflamatuvar, toksik, karsinojenik ve immunojenik etki göstermeyen bir

yapıda olması gerekmektedir. Bunun yanında iyileşme ve anjiyogenesize uygun porozitede ve pıhtı oluşumuna dayanıklı olması, endotelyumun gerekli salgıları yapan ve seçici geçirgen özellikte olması, greftin uygun elastikiyette ve dayanıklılıkta olması ile istenilen uzunlukta ve çapta en uygun sürede elde edilebilir olması beklenen özelliklerdir (21).

Klasik doku mühendisliği yöntemi, bölüm 2.2’de bahsedilen çekirdek teknolojiler kapsamında da düşünüldüğünde, hücre kaynakları, doku iskeleleri, biyoreaktör ve çevresel şartlar anahtar kelimelerdir. İstenilen greftin elde edilmesinde bu parametrelerin etkisi sözkonusudur.

#### **2.4.1. Hücre Kaynakları**

İmmün reaksiyon göstermemek adına hastaların kendisinden alınan otolog hücreler her ne kadar en uygun kaynak gibi görünse de daha önceki bölümlerde bahsedildiği üzere hastaların sağlıklı damar sıkıntısı bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Allojenik ya da zenojenik hücre kaynakları düşünüldüğünde ise immün cevaplar konusunda sıkıntılarla karşılaşmak mümkündür. Son yıllarda özellikle kök ve endotel progenitör hücrelerinin elde edilmesi ve vasküler doku oluşumu için kaynak olarak kullanımı üzerinde durulmaktadır. Bu bağlamda damarlardan izole edilen otolog endotel ve düz kas hücrelerinin yanında endotel progenitör hücreleri, kök hücreleri, kemik iliği hücreleri, göbek kordonu hücreleri, peritoneal hücreler de hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (21). Bir sonraki bölümde (2.4.2) literatürdeki temel çalışmalar sunulurken hücre kaynakları ve kullanımlarıyla ilgili daha ayrıntılı bilgiler verilecektir.

#### **2.4.2. Doku İskeleleri**

Doku iskelelerinin organizasyonu hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına yön verir. Bu yapıların doğal ortamı taklit edebilmesi ve hücrelerin moleküler düzeyde iletişim kurarak ilgili proteinleri salgılaması ve çevre ortamlarını oluşturmasını sağlaması gerekmektedir. Bu alandan ilk kullanılan doku iskelesi kollajen temellidir.

Bunun yanında hücrelerinden arındırılmış ve kendiliğinden düzenlenen doku iskeleleri de kullanılmıştır (6,37). Eğer iskele olarak bir polimer kullanılacaksa, bozunma ürünlerinin toksik olmadığı biyobozunur doku iskelelerinin kullanımı idealdir.

Vasküler doku mühendisliğindeki gelişmeler aşağıda doku iskeleleri yöntemlerinin gelişimi temel alınarak verilecektir.

#### **2.4.2.1. Kollajen temelli vasküler greftler**

Geliştirilen ilk yapay damar modeli, 1986'da Weinberg ve Bell tarafından kollajen temelli bir doku iskelesi modeliyle elde edilmiştir (38). Orta tabaka hücreleri olarak sığır SMC'lerin, dış tabaka hücreleri olarak fibroblastların oluşturduğu bu yapının lümenine daha sonra EC'ler ekilmiş ve üç tabakalı bir damar modeli sağlanmıştır. Bu hücreler kollajen bir jel içerisinde konumlandırılmış ve kollar Dacron'la desteklendirilmiştir. Endotel hücrelerinin ekildikten ve geliştikten sonra prostasiklin ve von Willbrand faktörü salgıladığı, bu nedenle fiziksel olarak işlevsel durumda olduğu gözlenmiştir. Fakat elastinin yeterli miktarda elde edilememesi nedeniyle istenen dayanıklılıkta bir damar olmadığı görülmüştür. Dacron desteğine sahip olmayan damarlarda 10 mmHg'nin altında patlama basıncı gözlenmiştir. (38).

L'Heureux ve ekibi bu tipteki kollajen jel yapıyı bir mil etrafına sararak insan göbek kordonu hücrelerini ekmişlerdir. Bu model, daha öncekilere göre daha dayanıklı olduğuna dair sonuçlar verse de, 120 mmHg'den az olan kopma basıncıyla yeterli dayanıklılığa ulaşamamıştır. Bu gibi yapılarda, orta tabakadaki hücrelerin ve elastin ve kollajen gibi proteinlerin düzenlenişi de vazoaktivite ve mekanik dayanıklılık açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Böylelikle L'Heureux ve ekibi, kullandıkları mil yapısıyla bu düzenlenmeyi arttırdıklarını tespit etmişlerdir (39).

Girton ve ekibi kollajen jel yapıların, besiyerlerindeki glikoz ve riboz şekerlerinin miktarlarını arttırarak, kollajen matriksinin glikasyonunu sağlamışlardır. Böylece 1 mm kalınlığında ve 3 mm çapında elde edilen damar yapısının kopma basıncı 225 mmHg olarak ölçülmüştür (40-41).

Nerem ve ekibi, kollajen yapılara halkasal basınç uygulayarak bu yapıların dayanıklılıklarını arttırıcı yönde çalışmalar yapmıştır. Sıçan aortundan elde edilen SMC'lerin ekili olduğu yapılar, 8 gün boyunca halkasal basınca maruz bırakılmış ve 142 kPa'lık katsayıyla 58 kPa'lık bir gerilim değeri vermişlerdir. Bu rakamlar, basınç uygulanmayan yapılarda 68 kPa ve 16 kPa şeklindedir (42). Bu araştırmacılar, matriks düzenlemesinin matriks metalloproteinaz (MMP) enzimleri sayesinde olduğu konusunda veriler elde etmişlerdir. Mekanik olarak stimüle edilmiş bu yapılardaki MMP-2 enziminin miktarında artış gözlenmiştir (2).

Fakat tüm bu çalışmalar, kollajen temelli yapıların 225 mmHg'lik basıncı aşamaması nedeniyle gerçek bir damarın yerini almasından çok uzaktır. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda bu yapıların gerçek damar gücünde olmasına yönelik deneyler yapılmıştır. Berglund ve ekibinin gerçekleştirdiği bir deneyde destekleyici kollar kollajen tip I'in daha dayanıklı bir yapı oluşturması için glutraldehit, UV ve dehidrotermal işlemlerle çapraz bağlanması ile oluşturulmuş, bu yapıya da hücre içeren bir kollajen tabakası eklenmiştir. "Construct Sleeve Hybrid" adı verilen bu yapının, çapraz bağlanmamış yapılarla karşılaştırıldığında daha yüksek patlama basıncına sahip olduğu gözlenmiştir (650 mmHg) (43).

İlerleyen zamanlarda kollajenle yapılan bir başka çalışmada HUVEC ve 10T1/2 mezenşimal öncü hücreleri fibronektin-tip 1 kollajen jel üzerine ekmişler ve 10T1/2 hücreleri HUVEC'lerle etkileştiğinde mural hücrelere dönüşmüşlerdir. Sadece HUVEC'lerin ekildiği yapılar, 10T1/2 hücreleriyle ekilen yapılardan daha az işlevsel (kasılma ve stabilite) olduğu görülmüştür. Bu nedenle 10T1/2 hücrelerinin yaşam süresini ve stabiliteyi arttırdığı ifade edilirken, yetişkinlerdeki progenitör hücrelerin iyi bir otolog hücre kaynağı olabileceği önerilmiştir (44). Buradan açıkça anlaşılacağı üzere, çalışılan hücre tipleri de en az üretilen doku iskelesi kadar önemlidir.

#### **2.4.2.2. Kendiliğinden düzenlenmiş (self-assembly) vasküler greftler**

Gerçek damara yakın vasküler greftlerin geliştirilmesinde yeni yöntemler önerilmiştir. Bunlardan biri kendiliğinden hücre düzenlenmesidir (cell self-assembly). Bu model, insan vasküler hücrelerinin çoğalarak canlı bir yapraklı yapı ve

ECM oluşturması ile elde edilir (45). Burada yine bir mil üzerine sarılan SMC katmanı orta tabakayı oluştururken, fibroblast katmanı da dış tabakayı oluşturur. 8 hafta boyunca salgılanan ECM ve fibroblastların salgıladığı dayanıklılık sağlayan proteinler sayesinde bu gibi yapılar 2000 mmHg'den daha yüksek bir kopma basıncına sahip olmuşlardır. EC'ler daha sonra oluşan yapının iç yüzeyine ekilir. Bu model otolog hücrelerin tamamen kendi salgıladığı proteinlerden meydana geldiği için olumsuz bir immun cevap riskini de ortadan kaldırmakla birlikte arteriyal implantasyona uygun bir mekanik g göstermektedir. Fakat *in vitro*'da mekanik dayanıklılığın dış tabakadaki proteinler tarafından sağlandığı, *in vivo*'daki damarlarda ise bunu orta tabakanın bütünlüğünün sağladığı düşünülürse, vücut içinde gerçekten bu sağlamlığı gösterip göstermeyeceği konusunda şüpheler doğmuştur. Ayrıca bu yöntemin zaman alması (5 haftalık kültür süresi ve implantasyondan önce 8 haftalık olgunlaşma süresi) olumsuz bir başka etkenken, bu sürenin dinamik koşullar altında kısaltılabileceği konusunda fikirler ne sürülmüştür (2).

Hücrelerin kendiliğinden bir damar yapısı oluşturmasını sağlamak amacıyla canlı vücudunun biyoreaktör olarak kullanıldığı önemli çalışmada ise Campbell ve ekibi, tavşanların ve sıçanların peritoneal kaviteleri içerisine çeşitli çaplardaki silastik tüpleri yerleştirmişler ve iki hafta sonunda bu tüpleri çıkarmışlardır. Bu tüplerin varlığında vücut içerisinde gelişen enfeksiyon tüplerin olduğu alana miyofibroblastların ve üzerlerine mezotel hücrelerin yayılmasına sebep olmuştur. Tüpler çıkarılırken ters dönen bu hücre yığını ite mezotel hücrelerinin (endotelyum) ve dışta miyofibroblastların (düz kas tabakası) kalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu yapı kollajen ve elastinden oluşan bir yatak içerisinde gerçek bir damara benzer bir şekil oluşturmuştur. Bu yapılar daha sonra elde edilen hayvanlara otolog greftler şeklinde dikilmişler ve en az 4 ay boyunca açıklıklarını korumuşlardır. Bu süre içerisinde bu yapılar yüksek elastik yapıya erişmişler ve kasılmalarını sağlayan miyofilamentleri oluşturmuşlardır (37).

### 2.4.2.3. Biyobozunur polimerik temelli vasküler greftler

Bir başka ve yaygın vasküler doku mühendisliği yöntemi de, biyobozunur polimerik iskele üzerine damar hücrelerini ekerek, hücreler ECM'lerini üretirken polimerin eşzamanlı olarak bozunması ve damar yapısının meydana gelmesidir. Bu alanda çeşitli polimerler kullanılmıştır. Bunların başında poliglikolikasit (PGA) gelir. PGA, gözenekliliğinin yüksek olması nedeniyle besin ve diğer moleküllerin difüzyonunu kolaylaştırır ve PGA'yı istenilen yapılarda üretmek mümkündür (6). Niklason ve ekibi, biyobozunur PGA meşi üzerine domuz aort hücrelerini ekmiş ve radyal basınç uygulayarak polimer üzerinde bu hücreleri kültür etmişlerdir. Bu süre içerisinde hücreler, polimerin bozunmasına eşzamanlı gerçekleşen ECM salgılarını gerçekleştirmişlerdir. Bu yapı, ECM salgısını arttıracak çeşitli biyokimyasalları (aminoasitler, vitamin C, bakırsülfat) içeren bir besiyeri içinde tutulmuş ve 8 hafta sonunda yapının iç yüzeyine EC hücreleri ekilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen yapıların 2000 mmHg üzerinde bir kopma basıncı gösterdiği saptanmıştır (46).

Bu tip çalışmalarda besiyeri içeriğinin iyi belirlenmesi gerekir. Çünkü bozunacak olan polimerle eşzamanlı olarak üretilen ECM moleküllerinin sentezlenmesinin artırılması gerekmektedir. Niklason ve ekibi, bu çalışmada besiyerine % 20'lik FBS, bazı aminositler (L-prolin, L-glisin, L-Alanin), vit C, bakırsülfat gibi molekülleri ekleyerek hücrelerin aralarında çapraz bağ kurmalarını, uygun biyokimyasal sinyallerin verilmesini ve dinamik ortamda gerçekleştirilen kültürle hücrelerin daha düzgün bir dizilim göstererek mekanik kuvvetin arttırılmasını sağlamışlardır. Bu duruma göre kopma basıncı dinamik kültürde ortamda 2000 mmHg, durgun kültürde 300 mmHg olarak ölçülmüştür. Bu durumun muhtemel sebeplerinden biri 8 hafta sonunda % 50 artan kollajen miktarı olabilir. Ayrıca hücrelerin ET-1 ve serotonin gibi vazoaktif etmenlere gösterdiği cevaplar da, büyük oranda kasılmayı sağlamıştır. Vit C verilmeyen ve üzerine radyal gerilim uygulanmayan doku örneklerinin zayıf histolojik organizasyon gösterdiği ve mekanik dayanıklılığında azalma olduğu gözlenmiştir. Yucatan minyatür domuzunda yapılan hayvan deneyiyle, bu damar yapısının arteriyal sistemdeki mekanik ortamı kaldırabildiği görülmüştür (46).

PGA'nın kopolimer halinde kullanıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Bunlardan biri PGA'nın polihidroksialkonat (PHA)'la beraber kopolimer haline getirilmiş ve koyun karotit hücreleri (EC'ler, SMC'ler ve fibroblastlar) bu yapının üzerine ekilmiştir. PGA'nın iç yüzeyi hücre tutunmasını ve doku gelişimini etkileme, PHA'nın dış yüzeyi de gerekli mekanik dayanıklılık ve 52 haftadan fazla bir sürede bozunma sağlama için kullanılmıştır. Bu greftler 7 adet kuzunun böbrek içi aortik segmentlerine yerleştirilmiş ve 5 ay boyunca açıklık sağlanmıştır. Kollajen ve DNA miktarı gerçek bir damarın mekanik dayanıklılığını sağlayacak ölçüde gözlenmekle birlikte, orta tabakada histolojik açıdan elastik fiberlerin varlığı gösterilmiştir (47).

Watanabe ve çalışma grubu PGA ile L-laktid ve  $\epsilon$ -kaprolakton'dan bir kopolimer üreterek bu yapının üzerine melez köpeklerin femoral ven hücrelerini ekmişlerdir. 7 günlük bir kültür sürecinden sonra aynı köpeklerin "inferior vena cava"larına implante edilen bu greftler herhangi bir daralma ya da genişleme gözlenmeden 13 ay boyunca açık kalmışlardır. Doku iskelesi 3 ayda bozunmuş, meydana gelen doku gerçek "inferior vena cava"ya benzer görünümde gözlenmiştir (48).

Hoerstrub ve ekibi de poli-4-hidroksibütirat (P4HB) ve PGA kopolimerini doku iskelesi olarak kullanmışlardır. Üzerine koyun karotid arter hücrelerini ektikleri bu doku iskelesini biyoreaktör ortamında basınçlı akışa maruz bırakmışlardır. Böylece hem lümenal yüzey hem de damar duvarı basınçlı ortamda gelişmiştir. Böylece kollajen ve hücre kütlesi artmış ve tabakalanmalar düzgün meydana gelmiştir (49). Hoerstrub ve ekibi daha sonraki bir çalışmasında insan kordon kanı hücrelerini hücre kaynağı olarak kullanmıştır. Bu sayede kişinin kendi damarlarına zarar verilmeden damar üretiminin sözkonusu olduğu ve göbek kordonunun kişiler için potansiyel hücre kaynağı olabileceği önerilmiştir (50).

#### **2.4.2.4. Hüresiz doku iskelesi yaklaşımı**

Vasküler doku mühendisliğinde geliştirilmiş bir diğer yöntem hüresiz doku iskelelerinin kullanımı yaklaşımıdır. Bu teknikte, hücrelerinden arındırılmış doku parçasının vücuda implante edilerek vücudun biyoreaktör gibi kullanılması ve çevre

dokulardan buraya hücre göçünün gerçekleşmesi söz konusudur. Bu alanda kullanılan dokular deri, sünnet derisi, bağ doku, peritoneum, kas, ince barsak mukozası ve üreter dokularıdır (6). Bu yöntemin en büyük sıkıntıları; otolog insan dokularının izole edilmesi, *in vitro*'da yapılan işlemlerin kontaminasyon riskini arttırması ve bundan ötürü implantasyonun zorlaşmasıdır (2).

Bu alanda yapılan ilk çalışma Badyak ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar, küçük bir barsak submukozası (SIS) parçasını tübüler hale getirerek vasküler bir greft elde etmişlerdir. Bu parça hücresiz, 100 µm kalınlığında olan kollojen bir tabakadır. Köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda 8 greften 7'si 120 gün boyunca açık kalmıştır (51). 5.5 mm çapındaki bir greftin kopma basıncı 3517 mmHg'dir. SIS grefti köpek karotid arterinin yarısı kadar uyumluluk gösterse de tipik bir damar greftine göre 4 kat daha uyumludur (52).

Hücresiz yaklaşımlara bir diğer örnek Huynh ve ekibi tarafından, tavşan arter "bypass" modeliyle gösterilmiştir. Burada da SIS'ten alınan kollajen tabakası deterjan özelliği göstermeyen ve kimyasal olmayan bir temizleme sürecinden geçirilerek hücrelerinden arındırılmıştır. Elde edilen tabaka çoğunlukla kollajen tip I içeren ve diğer proteinlerden, lipitlerden ve nükleik asitlerden arındırılmış bir yapıdır. Oluşturulan greftin dayanıklılığını arttırmak için greftin iç yüzeyine sığır kollojen tip I tabakası eklenmiştir. Eklenmeyen örneklerle kıyaslandığında bu yapının mekanik açıdan daha dayanıklı ve 1000 mmHg'den fazla kopma basıncına sahip olduğu görülmüştür (53).

Inoue ve ekibi, hücrelerinden arındırılmış insan dermal matriksini küçük çapta bir vasküler greft haline getirmişlerdir. Bu yapılar ePTFE'ye göre daha uzun süre açık kalmakla birlikte dikiş hattı üzerinde anevrizmalar göstermişlerdir (54). Buna benzer bir başka çalışmada köpek arterlerinin hücrelerden ve ilgili antijenlerden arındırılarak aselüler bir yapı iskelesi olarak kullanılmasıdır. Bu model köpeklerde kullanıldığında herhangi bir inflamasyon gözlenmezken kısmi endotelizasyonun olduğu saptanmıştır (55). Böyle greftlerin tam olarak uygulanabilir olması için, greftin iç yüzeyinin, düzgün ve tek sıralı bir EC tabakasıyla kaplanmış

olması gerekir. Bazı hayvan deneylerinde başarılı olursa da insanlarda trombozu ve intimal hiperplaziyi önleyecek bu gerekliliğin sağlanması daha zordur.

### 2.4.3. Kokültür Çalışmaları

Endotelyumun damardaki önemi ve SMC'lerle olan etkileşimi göz önüne alındığında ideal bir vasküler greft yaratmak için son yıllarda çalışmalar SMC ve EC kokültür modelleri üzerine yoğunlaşmıştır. Düz kas ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimi çözmek için çeşitli kokültür çalışmaları yapılmıştır. Bunlar; SMC ve EC'lerin, gözenekli bir membranın farklı taraflarında kültüre edilmeleri (56), SMC içeren kollajen jeller üzerinde EC'lerin kokültürü (57-58), EC'lerle SMC'lerin mikrotaşyıcı küreciklerde (59), EC'lerin doğrudan SMC'ler üzerinde kültüre edilmesi (60) ve dinamik koşulların sağlandığı bir biyoreaktör ortamında kokültüre edilmesi yöntemleridir (61). Endotel hücreleri, durağan (kasılabilir) yapıdaki düz kas hücrelerinin üzerinde, proliferen olan düz kas hücrelerinin üzerinde olduğundan daha hızlı çoğalmaktadır (62).

EC'lerin ve SMC'lerin birbirlerinin üzerinde biyokimyasal üretimi (63) ve hücre çoğalmasını artırma (64), bunun yanında lipoproteinlerin alınımını da etkilemesinden dolayı (65) iki hücre türünü ayrı ayrı kültüre etmek gerçek bir damar yapısını oluşturmada yetersiz kalmaktadır. Rainger ve ekibi, aterosklerozda lenfosit alınımını çalışmak üzere 0.4  $\mu\text{m}$ 'lik gözeneklere sahip bir membranın iki yanında endotel ve düz kas hücrelerini kokültür etmişlerdir (56). Gerçek bir damarda bu hücreler birbirlerinden 2-7  $\mu\text{m}$ 'lik gözeneklerden oluşan internal elastik lamina ile ayrılmışlardır. Böylelikle endotel ve düz kas hücreleri arasındaki iletişim kolaylaştırılmış olur. Bu nedenle, istenilen kokültür planı tek sıralı ve düzgün bir endotelyum oluşturmak ve bu hücrelerin düz kas hücreleriyle yeterli fiziksel bağlantı içinde bulunmasını sağlamaktır (66). Yapılan bir çalışma da endotellerin düz kas hücreleri üzerinde, arada herhangi bir molekül ya da malzeme olmadan nasıl üretilebileceği üzerinedir. Bu çalışmada sığır düz kas hücreleri  $5 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> oranında 4 gün boyunca üretilmiş, üzerine aynı hacimde endotel hücreleri ekilmiş ve tekrar 4 gün boyunca kültüre edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre endoteller, ECM

elemanlarının yetersiz olması nedeniyle düz kas hücrelerine iyi tutunamamış ve iyi çoğalamamıştır (66). Askorbik asit (vit C) varlığında kollajen sentezinin arttığı bilinmektedir (67). Bunun üzerine SMC'ler 4 gün boyunca vit C içeren besiyerinde inkübe edildiğinde ve kollajen tip IV için boyandığında, önemli miktarda kollajen üretildiği gözlenmiştir. Bunun üzerine endoteller bu yapı üzerinde kültüre edilmiş ve Dil-ACD-LDL işaretli kokültür boyamalarında EC'lerin daha fazla ürettiği ve tutunduğu gösterilmiştir. Mikrogözenekli yapıların kullanıldığı kokültür modelleri, bu hücrelerin arasındaki iletişimi kısıtlar. Bu nedenle bu yapıların kokültürde doğru bir fizyolojik model oluşturmadığı düşünülmektedir (66).

Denenen bir başka kokültür modeli; tip I kollajenden oluşmuş üç boyutlu bir jelin içine SMC'leri gömmek ve bu yapının yüzeyine EC'leri ekmek olmuştur (57). Fakat bu yapıda EC'lerin üremesi, düz kültür kaplarında gerçekleşen üremeden önemli ölçüde az gerçekleşmiştir. Bunun olası sebeplerinden biri tek bir çeşit kollajen kullanmanın gerçek damar yapısını yeterli ölçüde yansıtmaması olabilir; çünkü endotellerin yerleştiği zemin ağırlıklı olarak kollajen tip IV'ten oluşur. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada EC'lerin ve SMC'lerin birlikte kültüre edilmesinin EC'lerin tutunma ve yayılma yetenekleri üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bu deneyde, "insert" lerde 10 µm'lik polietilen teraflatat (PET) membranlar kullanılarak bir grup endotel hem düz kas hücreleriyle, diğer bir grup da tek başına kültüre edilmiştir. Daha sonra bu hücreler toplanmış, önceden fibronektinle kaplanmış 24 kuyucuklu pleytlere ekilmiştir. 30, 60 ve 90. dakikalarda hücrelerin canlılığına ve tutunmasına bakılmıştır. SMC'lerle kültüre edilen EC'lerin fibronektin yüzey üzerinde daha hızlı tutunduğu ve 30. dakikada bile yayılmaya başladığı görülmüştür (68). Bu sonuçlardan SMC'lerin, EC'lerin tutunmasını arttırdığı gözlenmektedir.

Korff ve ekibi mikrotaşyıcı küreciklerle yapmış oldukları deneyde SMC ve EC'lerin birlikte kültüre edilmeleri sonucunda, EC'lerin tek başına kültüre edilmelerinde görülen apoptosiz oranını azalttığını öne sürmüşlerdir (59). Bu nedenle de iki hücre türünün birlikte kültüre edilmesinin EC'lerin canlılığında önemli rol oynadığı düşünülebilir.

Lavender ve ekibi, endotellerin tek sıra halinde düz kas hücreleri üzerine tutunması sorununu, bu hücreleri doğrudan birbirleri üzerinde kokültüre ederken araya bazal membran proteinlerini koyarak tutunmayı kolaylaştırmak yoluyla çözmeye çalışmışlardır (60).

Varolan kokültür sistemleri hücreleri birbirine 10-50 µm yaklaştırmaktadır. Bu uzaklıkta hücreler birbirleriyle etkileşim halinde olsalar bile bazı, özellikle ömrü kısa metabolitlerin salgılandıktan sonra etkileri yeterli süre için görülmeyebilir. Ayrıca kokültür modellerinde denenen, biyobozunur olmayan bir polimer yapısı doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılmayacağı için daha biyomimetik bir yapıya ihtiyaç vardır.

Düz kas hücrelerinin yüksek serum oranında proliferatif (poligonal şekilde) fenotipe, düşük serum oranında ise kasılır (iğ şeklinde, uzamış) fenotipe sahip olduğu bilinmektedir. EC'lerin de normal ve sağlıklı büyümeyi sağlayabilmeleri için seruma ihtiyaçları vardır, aksi takdirde "kaldırım taşı" morfolojisini oluşturmadıkları, zayıf tutunma ve yetersiz proliferasyon gösterdikleri gözlenmiştir. Lavender ve ekibi yapmış oldukları kokültür çalışmasında SMC'lerin proliferasyonu için önce yüksek oranda (% 20) FBS kullanmışlar, EC'leri ektikleri zaman % 3.3 FBS'li besi ortamı ile kokültüre etmişlerdir (60).

Williams ve ekibi, perfüzyon biyoreaktör sisteminde PGA üzerine iki yönlü olarak ektikleri SMC'leri 25 gün süreyle kültüre etmişler, bu sürenin 10. ve 23. gününde EC ekerek bu hücrelerin sırayla 15 ve 2 gün boyunca kokültüre edilmesini sağlamışlardır. Daha sonra 2 ve 15 gün boyunca kokültüre edilmiş yapay damar örnekleri alınarak hücrelerin dizilimleri ve yayılımları ile içerdikleri kollajen ve glikozaminoglikan miktarları incelenmiştir. Buna göre 2 gün boyunca kokültüre edilmiş damarlardaki SMC'lerin lümen ve dış kısımda yoğun oldukları, 15 gün boyunca kokültüre edilenlerde ise daha düzgün ve homojen dağıldıkları gözlenmiştir. Bunun yanında SMC'leri işaretlemek için antikorları kullanılan α-düz kas aktinleri ve miyozin ağır zincir proteinlerinin 15 gün kokültüre edilmiş damar örneklerinde daha fazla ifade edildiği ve daha koyu kalponin boyaması gösterdiği tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak EC'lerin sadece SMC'lerin proliferasyonu

üzerine değil, aynı zamanda SMC'lerin dağılımı ve farklılaşması üzerine de etkili olduğu düşünülebilir. Ayrıca PGA fiberler, 2 gün boyunca kokültüre edilen örneklerin lümeninde gözlenirken 15 gün boyunca kokültüre edilen örneklerin lümeninde gözlenmemiştir (61).

#### 2.4.4. Klinik Çalışmalar

Kardiyak defektler, kongenital anomalilerin başında gelen hastalıklardır. Olgun insanlarda meydana gelen kalp rahatsızlıklarını tedavi etmede büyük gelişmeler sağlanmış olmasına rağmen kongenital kalp hastalıklarının tedavi etmede halen zorluklar yaşanmaktadır. Bu anomalilerin hepsi farklı özellikler gösterse de en yaygın rahatsızlıklar pulmoner dolaşımdaki deoksijenize olmuş kan ve sistemik dolaşımdaki oksijenize olmuş kanın karışmasıyla sonuçlanır (69). Müdahale edilmemiş ventrikül kardiyak anomalileri % 70 ölümle sonuçlanır. Tedavi yöntemi cerrahi operasyondur (70-71). Cerrahi operasyon olmadan, erişkinliğe ulaşmak neredeyse mümkün olmamaktadır. Bu operasyonlarda amaç pulmoner ve sistematik dolaşımın birbirinden ayrılmasıdır. Bu sayede sistematik dolaşımdaki kan oksijenlenir, fazla hacim yüklenmesi olmaz ve kalp zorlanmaz. Fontan operasyonu adı verilen bu yöntemin geliştirilmiş adı "extra cardiac total cavopulmonary connection (EC TCPC)"dir. Fakat bu yöntem bile hala tam bir iyileşmeden bahsedebilmek için yeterli değildir. Ayrıca, sağlıklı doku eksikliği ve yetersiz hücre sayısı nedeniyle hastanın kendi dokusunun kullanılamayacağı durumlar mevcuttur. Bu nedenle politetrafloroetilenden (PTFE ya da GoreTex®) imal edilmiş vasküler greftler kullanılmaktadır (72). Zaman içerisinde PTFE yerine Dacron® kullanılmaya başlanmıştır ama literatüre bakıldığı zaman Dacron® kullanımının başarısızlıkla sonuçlanma oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (70). Bu sorunlar; tıkanıklık, büyüme potansiyeli eksikliği, enfeksiyon riski ve tromboembolik komplikasyonlardır (69). Bu güne kadar elde edilen en iyi sonuçlar ortalama % 80 civarındaki başarı oranıyla otolog doku greftlerinde gözlenmiştir (73). Kardiyovasküler doku mühendisliği uzuv ya da hayat kurtaran ve geniş yaş aralığındaki hastalara hitap eden bir alan olması bakımından, doku mühendisliği çalışmaları içinde ayrı bir önemi

vardır. Piyasada Cartigel, Apligraf ve Dermagraf gibi doku mühendisliğiyle elde edilmiş ticari ürünler mevcuttur. Yapılan çalışmaların sonuçları bizlere doku mühendisliği damar greftlerinin de ticari olarak üretimlerinin gerçekleştirilmesi yönündeki umutları arttırmaktadır (74).

Vasküler doku mühendisliği yöntemiyle klinikte yapılan ilk çalışma 2000 yılında Tokyo'da Shin'oka ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. 4 yaşındaki bir kız çocuğunun 39 aylıkken geçirdiği Fontan operasyonundan 7 ay sonra, sağ orta pulmoner arterinde oklüzyon gözlenmiştir. Bunun üzerine hastanın periferik veninden alınan 2 cm'lik parçadan hücreler izole edilmiş ve hücre kültürü yapılmıştır. 8 haftada  $12 \times 10^6$  rakamına ulaşan hücreler PGA ile desteklenmiş PCL-PLGA (ağırlık/1:1) bir tübüler polimer yapının (10 mm çapında, 20 mm uzunluğunda, 1 mm kalınlığında) üzerine ekilmiş ve 10 gün sonra hastaya transplantasyon yapılmıştır. Daha öncesinde daralan damar yapısı tekrar kendini toparlamış ve ameliyattan 7 ay sonra herhangi bir olumsuzluk yaşanmayarak klinik uygulamalardaki ilk başarılı örneği teşkil etmiştir (75).

TEVA'ların klinikteki diğer uygulamaları, EC TCPC ameliyatlarında, yine Tokyo/Japonya'da gerçekleştirilmiştir (75-77). Doku mühendisliği yöntemleriyle elde edilmiş 23 adet greftin 6 sene boyunca *in vivo*'daki durumu gözlenmiştir. Bu greftler, herhangi bir anevrizma ya da hasar görmeden işlev göstermiştir. 18 mm'den küçük çapa sahip yapılarda stenoz gözlenirse de, anjiyoplastiyle müdahalede bulunularak tedavi sağlanmıştır. Kaydedilen hiçbir tromboembolik, hemorajik ve enfeksiyonlu komplikasyon olmamıştır ve hiçbir greft değişimine gerek duyulmamıştır. Bu greftlerin büyüme potansiyelleri bilgisayar ortamında görüntülendiğinde uyumlu ve güvenli bir gelişim içinde olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmaların başarılı sonuçlanması ile, FDA'den alınan onayla, çalışmaların ABD'de sürdürülmesi yolunda da izin alınmıştır (69).

Klinik alanda gerçekleştirilen çalışmalardan bir diğeri, polispleni hastası 12 yaşındaki bir erkek çocuğu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu hastaya takılan kanal yapısı (conduit) 7 ay sonunda daralmış ve içinde pıhtı oluşumu gözlenmiştir. Alternatif yöntem olarak bu hastanın periferik damarından yaklaşık 2 cm alınmış ve

damar duvarından hücreler izole edilerek kültüre edilmiştir. Daha sonra bu hücreler, PGA ile desteklenmiş PCL-PGA (ağırlık/1:1)'dan üretilmiş tübüler polimer yapısının üzerine ekilmiştir. 1 mm kalınlığında ve 20 mm çapında olan bu yapı, 8 haftada bozunabilme özelliğine sahiptir. Hücrelerin ekiminden 10 gün sonra bu yapı hastaya transplante edilmiştir. 4 ay sonunda bu hastada, polimerin tamamen bozunduğu ve herhangi bir pıhtı olayının görülmediği saptanmıştır (77).

Yapılan bir başka klinik çalışmada ise, yaşları 29 ile 89 arasında değişen ve farklı vasküler rahatsızlıklara sahip olan 10 hastaya kendi otolog hücrelerinden üretilmiş TEBV'ler takılmış ve *in vivo*'daki arteriyel basınca ne ölçüde dayanabildikleri gözlenmiştir. 1. hasta bu grefti 13 aydan fazla kullanmış, sonrasında böbrek transplantasyonu olmuştur. Bu greftin üzerinde çok sayıda delik gözlenmesine rağmen ameliyata kadar işlevselliğini korumuştur. 2. hasta farklı sebeplerden dolayı yaşamını yitirmiştir. 3. hasta 12. haftada düşük akış hızına bağlı olarak (<500 mL/dk) tromboz sorunu yaşamıştır. 4., 5. ve 6. hastalarda grefler, herhangi bir sorun olmadan işlev göstermişlerdir (78).

Kemik iliği kök hücrelerini elde etmek, hastadan damar biyopsisi alarak hastayı ayrıca hastanede tutmak gibi zahmetli bir iş değildir, ayrıca alınan örnekten daha fazla sayıda hücre elde edilir. Alınan hücreler doğrudan doku iskeleleri üzerinde kültüre edileceği için kontaminasyon riski azalır. Bu hücrelerin besiyerine fazla madde eklenmesine ihtiyaç yoktur. Matsumura ve ekibi, bu klinik çalışmada BMCs besiyerine serum koymamışlardır. Aynı ekibin 3, 7 ve 14 yaşlarında, çeşitli kalp-damar rahatsızlıklar olan kız çocuklarına yerleştirdikleri greftlerdeki kan akış hızı gerçeğine çok uygun olmaklar birlikte greftlerde herhangi bir daralma yaşanmamıştır. 3 yaşındaki kız çocuğunun atriumuna yerleştirilen yapı, literatürde, kalbe takılan ilk greft olma özelliğini taşımaktadır (79).

L'Heureux ve ekibi, bu tip greftlerin klinikteki uygulamalarının başarılı olması için en az dört koşulu sağlaması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Bunlardan ilki safen venlerindeki atış basıncına eş bir basınç elde etmektir (> 1.700 mmHg). İkinci olarak insan hücrelerinin kullanımında yorgunluk gücü göstermesi yani çapının belli bir süre sonunda bile sabit kalması gerekmektedir. Üçüncü olarak trombojenik olmayan,

düzgün bir endotel yapısı ve son olarak da yaş ve risk de göz önünde bulundurulduğunda hücrelerin uygunluğu ve sürekliliği sağlanmış olmalıdır (74). Safen ven greflerin görece daha erken yaşanan tromboz oranı (implantasyondan 12 ay sonra % 15 oranında), büyük oranda endotelyumun zarar görmüş olmasına bağlanmaktadır (80).

Sonuç olarak, vasküler doku mühendisliği son yıllarda oldukça büyük gelişmeler göstermiş, hatta bazı greftler klinik aşamalarda kullanılmıştır. Fakat ideal bir damar grefti henüz elde edilememiştir. Deney sürecini etkileyen parametrelerin çeşitliliği, kullanılan taşıyıcı yapıların ve hücre kaynakların henüz tam olarak optimize edilememesi öne çıkan en büyük sorunlardandır. Araştırma sonuçlarından damar ve kalp kapakçıkları gibi deri ve kıkırdağa göre daha karmaşık yapıları *in vitro* koşullarda üretmede yeni hücre kaynaklarının kullanılması ve biyolojik açıdan uyumlu yapıların geliştirilmesi gerektiği çıkmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

Dulbecco'nun minimum esansiyel ortamı (Dulbecco's minimum essential medium, DMEM), fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin, gentamisin, penisilin/streptomisin, heparin, fosfat tamponu (PBS), sodyum piruvat, HEPES tamponu, Hanks' tuz solusyonu, tripsin-EDTA Biochrom (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kollajen A Biochrom, (Almanya) ve BD Biosciences (A.B.D.), dimetilsülfoksit (DMSO) Origen (İsveç), antibiyotik-antimikotik solusyonu, fibronektin, laminin, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), platelet eldeli büyüme faktörü (PDGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit (MTT), florosein izotiyosiyanat (FITC), alkalin fosfataz (ALP), monoklonal anti-miyozin, von Willebrand faktörü (vWF), monoklonal anti-kalponin, monoklonal anti-anti düz kas aktini ( $\alpha$ -SMA) antikorları, 5-bromo, 4-kloro, 3-indolilfosfat (BCIP)/nitro mavisini tetrazolyum klorür (NBT) alkalin fosfataz kromojeni, vitamin C, L-prolin, L-glisin, L-alanin, L-lizin solusyonu, bakır sülfat, penisilin G Sigma-Aldrich (A.B.D.)'den kullanılmıştır. Enjektör tipi filtreler (0,22  $\mu$ m) Sartorius (Almanya), poliglikolik asit (PGA) meş (1 mm kalınlığında, % 97 poröz) Concordia Manufacturing (A.B.D.), tetramethylrhodamine (TRITC) Invitrogen (A.B.D.) firmalarından temin edilmiştir. Hücre kültürü sarf malzemeleri Greiner Bio-one (Almanya)'dan, 4 kuyulu lamalar Electron Microscopy Sciences'dan (A.B.D.) kullanılmıştır.

Otoklav Raypa (İspanya), inkübatör Heracell (Almanya), laminar kabin Hersafe KS (Almanya), santrifüj Unicen 15D Herolab (Almanya), sıcak su banyosu Memmert (Almanya), ışık mikroskobu Leica (Almanya), floresan mikroskobu DFC 490 kamera bağlı Leica DM6000B (Almanya), Mekanik test cihazı Lloyd LRX5K model Lloyd Instrument Limited (Birleşik Krallık)'den kullanılmıştır. SEM görüntüleri Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezinde (UNAM, Bilkent Üniversitesi) Quanta 200 FEG markalı taramalı elektron mikroskopisinden alınmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Sterilizasyon

Diseksiyon malzemeleri, cam şişeler ve petrilere önce musluk suyu, sonra distile su ile yıkanarak kurutulmuş ve alüminyum folyo ile sarılarak 121 °C'de 45 dk boyunca otoklavda steril edilmiştir. Sıvı ve pipet uçlarının sterilizasyonu 121 °C'de 30 dk boyunca otoklavda yapılmıştır. Biyoreaktörlerin sterilizasyonu, reaktörler hazırlandıktan sonra etilen oksit'le gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. Kültür Kaplarının Kollajen ile Kaplanması

Endotel hücrelerin kültür edilmesinde kollajen kaplı kültür kapları kullanılmış bu nedenle iki farklı kollajen kullanılmış ve kaplama aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

BD Biosciences steril Kol tip I 4.52 mg/mL stok çözeltisinden 50 µg/mL'lik solüsyon steril 0.01 M HCl ile hazırlanmıştır. Kültür kabının yüzeyine 5-10 µg/cm<sup>2</sup> gelecek şekilde eklenmiş, bir saat oda sıcaklığında tutulmuş ve steril PBS ile 4 kez yıkanarak asit iyice uzaklaştırılmıştır.

Biochrom'dan alınan steril kollajen (Kol A, tip I ve en fazla % 10 tip III) 1/1 oranında steril PBS ile karıştırılmıştır. Bu karışımın 1 mL'si 10 cm<sup>2</sup>'lik kültür alanına eklenmiştir. 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilen flasklardan bu sürenin sonunda Kol A çözeltisi çekilmiş, steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Kol A'nın polimerleşmesi için UV altında 2-8 saat beklenmiştir.

### 3.2.3. Endotel ve Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

Çoban Et (İzmir), Yenikent (Ankara) mezbahalarında genç sığırlardan (6 aylık, 1 yaş) steril pens ve makas yardımı ile çıkartılan aort örnekleri antibiyotikli taşıma solüsyonu (Hanks' veya % 10 FBS ve % 0.5 antibiyotik-antimikotik solüsyon içeren DMEM) içeren şişelere alınarak strafor kutularda buz kasetleri (+4 °C) ile soğutularak laboratuvara taşınmıştır. Örnekler laboratuvarında laminar akışlı kabinde % 0.5 antibiyotik-antimikotik içeren PBS ile yıkandıktan sonra steril cam petrilere yerleştirilmiş, steril pens, makas ve bistüri yardımı ile damar örneklerinin önce dış

kısımındaki bağ doku parçaları uzaklaştırılmıştır. Yeterince temizlendikten sonra farklı bir steril petriye alınan damar örnekleri farklı makaslar ile boyuna kesilerek açılmıştır. Açılan damar parçalarının iç yüzeyinde bulunan endotel hücrelerini izole etmek için steril bir bistüri yardımı ile bu tabaka nazikçe kazınmıştır. Bistürinin üzerinde kalan hücreler antibiyotikli PBS ile 15 mL'lik santrifüj tüplerinde yıkanmış, sonra santrifüjlenerek (800 rpm, 5 dakika) hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken hücreler 2-3 mL besi ortamı ile süspanse edilmiş, 35 mm'lik petrilere ekilerek kültür edilmiştir. Diğer taraftan iç yüzeyi kazınmış damar parçaları ise düz kas izolasyonu için uygun büyüklüklerde parçalara ayrılarak 10 mm<sup>2</sup> ve 60 mm<sup>2</sup>'lik petrilere yerleştirilmiştir. Tutunan parçaların üzerine kurummasını önleyecek kadar besiyeri damlatılarak inkübatöre alınmıştır (37 °C ve % 10 CO<sub>2</sub>). 24 saat sonra bu eksplant parçaların üzerini örtecek kadar düz kas hücresi kültür besiyeri eklenmiştir. Kültürlerin devamında 48 saatte bir besiyerleri değiştirilmiştir. Düz kas hücre kültürlerinde 7-10. günden sonra damar eksplantlarından hücre göçü mikroskop altında incelenmiştir. Hücre karakterizasyonları immunokimyasal testlerle yapılmıştır. Düz kas ve endotel hücrelerin kültür edildiği besi ortamları Tablo 3.1'de verilmiştir. Kültür edilen hücreler farklı pasajlara getirilerek ileriki çalışmalar için dondurularak saklanmıştır. Tüm çalışmalar hücre kültürü 37 °C ve % 10 CO<sub>2</sub> ortamında, HeraCell (Almanya) inkübatörde yapılmıştır.

### **3.2.4. Endotel ve Düz Kas Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Karakterizasyonu**

Hazırlanan kültürlerde SMC ve EC'lerin karakterizasyonları immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir. Bu amaçla SMC'lere özgül olan alfa-düz kas filamentleri ( $\alpha$ -SMA), ile EC'ler için ayırt edici von Willebrand faktörünün varlığı uygun antikorlarla hem peroksidaz hem de floresan mikroskoplarında incelenmek üzere saptanmıştır. Bunun için genç buzağı aortasından izole edilen endotel ve düz kas hücreleri çoğaltılarak pasajlandıktan sonra P/4 hücreleri konfluent hale getirilmiş ve sonra 4 kuyulu lamlara ekilerek hücrelerin belli bir

yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Belli bir yoğunluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra aseton ile fikse edilmiştir.

SMC hücrelerinde alfa-düz kas aktin ( $\alpha$ -SMA) filamentlerinin varlığını belirlemek için aseton ile fikse edilen hücreler,  $\alpha$ -SMA (fare IgG2a izotip) ile inkübe edilmiştir. Floresan inceleme için FITC işaretli sekonder antikor ve peroksidaz yöntemi için peroksidaz anti-fare kullanılmıştır. EC'lerin tanımlanması için hücreler, von Willebrand faktör (tavşan anti-insan von Willebrand IgG) ile inkübe edilmiştir. Floresan inceleme için TRITC işaretli sekonder antikor ve peroksidaz yöntemi için ALP anti-tavşan kullanılmıştır. Hem peroksidaz hem floresan işaretlemeleri yapılan hücreler ışık ve floresan mikroskobunda görüntülenmişlerdir.

**Tablo 3.1.** Besiyerlerinin içerikleri.

<b>Endotel hücresi kültür besiyeri</b>	<b>Endotel hücresi zengin besiyeri</b>
500 mL DMEM	500 mL DMEM
% 10 FBS	% 10 FBS
% 1 L-glutamin	% 1 L-glutamin
% 0.2 penisilin-streptomisin	% 1 penisilin-streptomisin
125 µg/mL heparin	125 µg/mL heparin
	1 ng/mL VEGF
	2 ng/mL FGF
<b>Düz kas hücresi kültür besiyeri</b>	<b>Düz kas hücresi zengin besiyeri</b>
500 mL DMEM	500 mL DMEM
% 20 FBS	% 20 FBS
% 1 L-glutamin	% 1 L-glutamin
% 0.2 penisilin, streptomisin	%1 HEPES
	% 1 sodyum piruvat
	30.3 mg penisilin G
	10 g L-ala
	25 mg Vit C
	25 mg L-gly
	25 mg L-pro
	3ng/mL CuSO <sub>4</sub>

### 3.2.5. Hücrelerin Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi

Hücrelerin büyüme eğrilerinin çizilmesi, hücrelerin belirli uyaranlar altında verecekleri cevabın değerlendirilmesi için kullanılır. Bunun yanında hücrelerin tutarlılığının, en uygun sulandırma oranının ve ekim etkinliği ile hücrelerin pasajlanacağı en uygun zamanı belirlemek için uygun veriler sunar (81).

EC'lerin büyüme eğrisi grafiğini çıkarmak için hücreler P/4'e getirilmiştir. 90 Adet 35 mm'lik petri Kol A ile kaplanmış ve her bir petriye  $1 \times 10^4$  hücre ekilerek üzerlerine 1 mL besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin tutunması için 2 saat beklendikten sonra ilk 3 petriden 1 mL'lik besiyeri çekilerek, hücre sayımı yapılmış ve toplam hücre sayısından çıkarılarak ilk günde tutunan hücre sayısı bulunmuştur. Diğer petrilere de besiyerleri çekilmiş, hepsine taze 2 mL EC besiyeri eklenmiştir. Her gün aynı saatte olmak suretiyle 3'er petrideki hücre sayısı tripan mavisiyle sayılmış ve 11 güne ait büyüme eğrisi grafiği elde edilmiştir. Deneyler 11 gün boyunca 3'er adet 3 seri şeklinde gerçekleştirilmiştir.

P/4'teki SMC'lerin büyüme eğrisi grafiğini çizmek için de EC'lerdeki prosedürün aynısı uygulanmış fakat petri kapları Kol A ile kaplanmamıştır.

Hücrelerin jenerasyon sayısı (n) ve ikilenme süresi (d) için sırasıyla aşağıda verilen eşitlik 1 ve 2 kullanılmıştır. Bu eşitliklerde kullanılan hücre sayıları büyüme grafiklerinin doğrusal olduğu alandan seçilmiştir.

$$\text{jenerasyon sayısı (n)} = (\log C_{t_2} - \log C_{t_1}) / \log 2 \quad (1)$$

$$C_{t_1} = t_1 \text{ zamandaki hücre sayısı, } C_{t_2} = t_2 \text{ zamandaki hücre sayısı}$$

$$\text{ikilenme süresi (d)} = t/n \quad (2)$$

$$t = t_2 - t_1$$

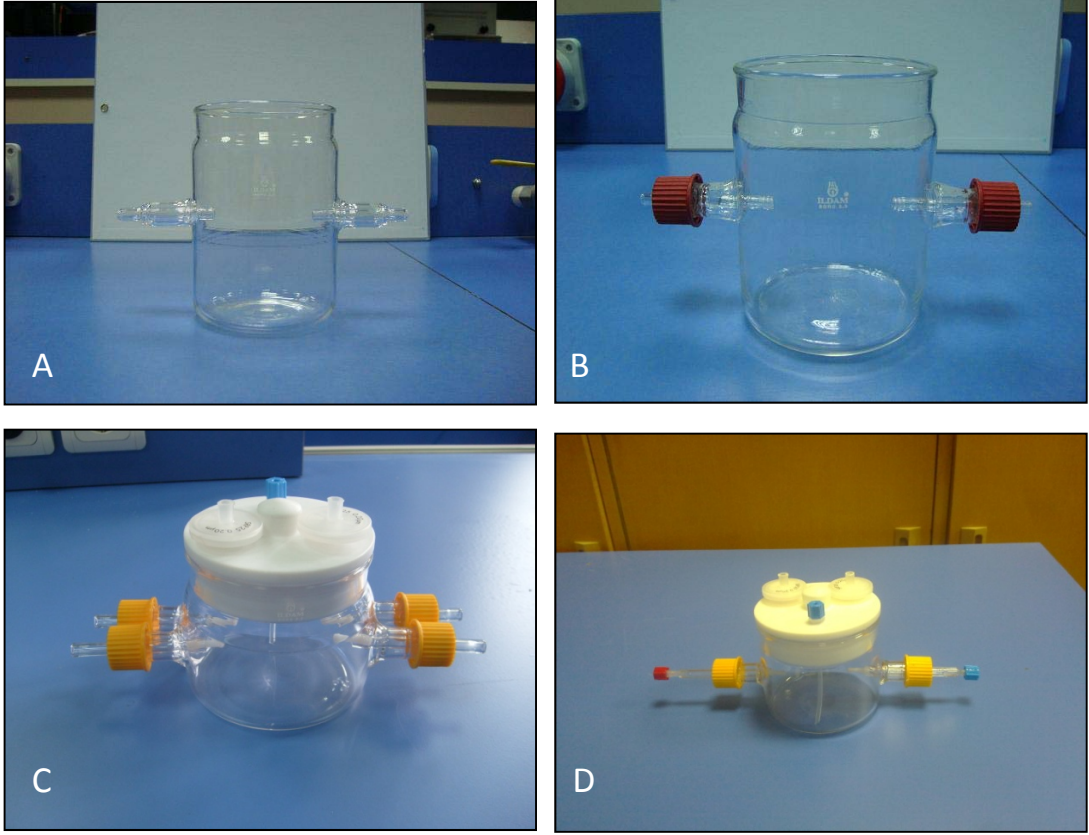
### 3.2.6. PGA Meşlerin Yüzey Modifikasyonu

PGA meşlerin hidrofiliğini artırmak amacıyla yüzey modifikasyonunun yapılması planlanmıştır. Bunun için PGA meşler önce 30 sn. % 95'lik etanolde tutularak nemi uzaklaştırılmış, daha sonra 1 N NaOH ile yaklaşık 1 dakika muamele edilerek ardından iki kez distile su ile yıkanarak, liyofilizatörde kurutulmuştur. Bu işlem ile PGA meşlerin yüzeyindeki ester gruplarının hidrosil ve karboksil gruplarına dönüşmesi sağlanmıştır (82).

Modifiye edilen PGA meşlerin yüzeyleri ATR-FTIR spektroskopisi [PerkinElmer Spectrum 65 (ABD)] ile incelenerek, morfolojileri ise SEM ile görüntülenmiştir.

### 3.2.7. Biyoreaktör Sisteminin Tasarlanması

Damar greftinin oluşturulacağı biyoreaktör sistemi, tek ve çift kollu olmak üzere tasarlanmıştır (Şekil 3.1). Bu el yapımı cam reaktörlerin kollarının içine uçları Dacron parçalarını tutturmak için tırtıklı olan, 3 mm çapına sahip cam borular takılmış ve plastik kapaklarla desteklenmiştir. PGA meşler, bu iç kollardan geçen 3.2 mm çapındaki silikon tübün etrafına sarılarak tübüler hale getirilmiş ve 5-0 poliglaktin ve PGA ipliklerle dikilmiştir. Tübüler meşin kenarlarına Dacron parçalar 5-0 poliester iplikle dikilmiş ve iç kollara tutturulmuştur. Biyoreaktörün teflondan yapılmış kapağına gaz alışverişini sağlayacak 2-3 adet steril filtre (0.22 µm ) ve besi yeri değişimi bir giriş konulmuştur. Bu şekilde hazırlanan biyoreaktörler etilen oksit ile steril edildikten sonra damar oluşturmak üzere kullanılmıştır.



**Şekil 3.1.** Biyoreaktörler. A) İç kollar sabit, hacim 500 mL, B) İç kollar hareketli, hacim 500 mL, C) İki kollu biyoreaktör, hacim 425 mL. D) Tekli biyoreaktör, hacim 325 mL.

### 3.2.8. Biyoreaktörde Doku Mühendisliği Vasküler Greftlerin İnşa Edilmesi

#### 3.2.8.1. Orta tabakanın oluşturulması

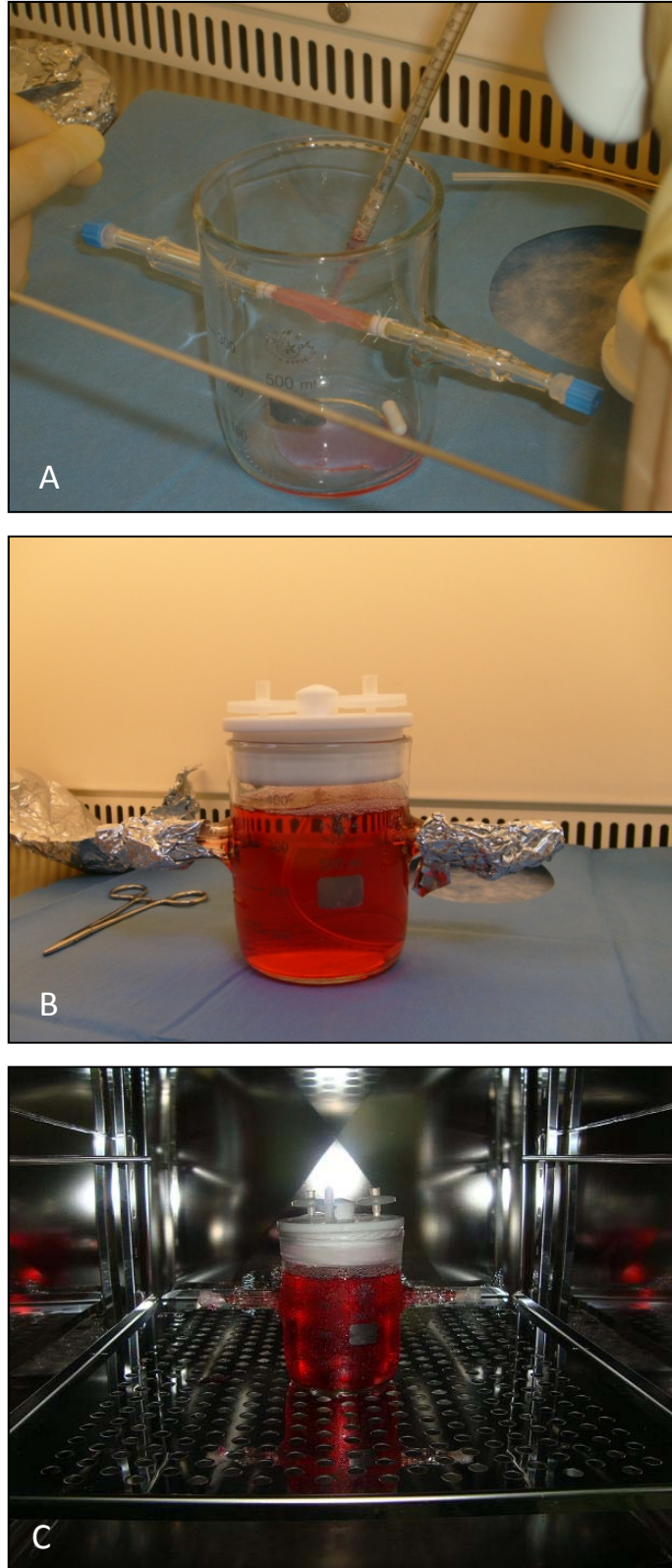
Primer kültürle elde edilen SMC'ler 3. ve 4. pasaja geldiklerinde, hazırlanan reaktörlerdeki PGA meşlerin üzerine Tablo 3.2'de verildiği miktarlarda ekilerek belli sürelerle kültür edilmiştir (Şekil 3.2.). Biyoreaktörlerin besiyerleri 3-4 günde bir yarı yarıya değiştirilmiş ve kültür süresi boyunca kollajen salgısını arttırmak için her gün 50  $\mu\text{m}/\text{mL}$  Vit C eklenmiştir. Oluşturulan orta tabakanın zamanla gelişimini izlemek amacıyla belli inkübasyon süreleri (4, 6, 8 ve 12 hafta) sonunda damar örnekleri biyoreaktörden kesilerek çıkarılmış ve immünohistokimyasal testlere tabi tutulmuştur.

### 3.2.8.2. Endotelyumun oluşturulması

Damar dokusunun orta kısmı oluştuktan sonra iç kısımdaki silikon tüp çıkartılmıştır. Damar lümenine daha önce yapılan ko-kültür deneme sonuçları doğrultusunda kollajen çözeltisi ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) geçirilerek 90 dakika inkübe edilmiştir (83). Kollajen inkübasyonundan sonra damar lümeni PBS ile yıkanarak fazla kollajen uzaklaştırılmıştır. Tablo 3.2.'de belirtilen miktarda EC enjektör yardımıyla damar lümenine ekilmiştir. EC'lerin yapışması için 12 saat, 10 gün boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiş ve bu sürelerin sonunda çıkarılan dokular immunohistokimyasal testlerle incelenmiştir.

**Tablo 3.2.** Damar greftlerinin inşasında kullanılan hücre sayıları.

Kültür süresi	SMC sayısı	EC sayısı	Ko-kültürde kullanılan substrat
4 haftalık	$7.8 \times 10^6$	-	-
6 haftalık	$8.1 \times 10^6$	-	-
8 haftalık	$8.0 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	Kol A ve – (boş)
12 haftalık	$5.7 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	Kol A



**Şekil 3.2.** A) Biyoreaktörlere orta tabakanın oluşturulması için SMC'lerin ekilmesi.  
B) Hazırlanmış biyoreaktör sistemi. C) Hücrelerin inkübasyonu.



**Şekil 3.3.** A) Biyoreaktörde oluşturulan orta tabaka. B) Endotel hücrelerinin damar lümenine ekilmesi.

### 3.2.9. Vasküler Greftlerin Karakterizasyonu

#### 3.2.9.1. İmmunohistokimyasal karakterizasyon

Belli sürelerde üretilen damar greftlerinde kollajen fiberler Masson's trikrom, elastin fiberler Verhoeff ile incelenmiştir. SMC'lere özgül olan alfa-düz kas filamentlerin ( $\alpha$ -SMA), miyozin ağır zincir (MHC) ve kalponin proteinlerinin dağılımı ve EC'ler için ayırt edici von Willebrand faktörünün varlığı uygun antikorlar (peroksidaz ve floresan) kullanılarak incelenmiştir (bölüm 4.2'de ayrıntılı olarak

verilecektir). Hem tekli hem çift boyama yapılan greftler peroksidaz ve floresan mikroskoplarında değerlendirilmiştir. Bu amaçla (H&E, Masson's ve Verhoeff hariç) birkaç milimetrelik parçalara ayrılan damarlar dondurucu ortam ile sıvı azotta dondurulmuş, 7 µm'lik kesitler kriyokesit yöntemiyle jelatin kaplı lamlara alınmıştır. Soğuk asetonla 4 °C'de 10 dk boyunca fikse edilen lamlar kurutulduktan sonra etrafları dakopenle çevrilmiştir. % 0.1'lik Triton X ile 3 dk dokulara boya alınışını kolaylaştırmak için permeabilizasyon yapılmıştır. PBS ile yıkanan lamlara daha sonra % 3'lük BSA ile 1 saat blokaj yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra dokulara primer antikolar damlatılmıştır. Buna göre SMC'ler için anti-αSMA (keçi anti-fare) ve EC'ler için (keçi anti-tavşan), kollajen tip I, tip III ve tip IV için (anti-fare) primer antikoları 1/200 oranında sulandırılarak kullanılmış, 1 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda EC'lerde peroksidaz için sekonder olan ALP (keçi anti-tavşan) ve floresan için sekonder olan TRITC (eşek anti-tavşan), SMC'ler, kollajen tip I, tip III, tip IV için de peroksidaz için sekonder olan (keçi anti-fare) ve floresan için sekonder olan (keçi anti-fare) FITC 1/100 oranında sulandırılarak kullanılmış, 30-45 dk. inkübe edilmişlerdir (Tablo 3.3.). Son olarak DAB (kullanıma hazır) kahverengi için, BCIP/NBT de mavi rengini vermesi için kromojen olarak uygulanmıştır. Floresanda çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır.

**Tablo 3.3.** İkili boyamada kullanılan primerler ve sekonderler.

İLK PRİMER	İKİNCİ PRİMER	İLK SEKONDER	İKİNCİ SEKONDER
vWB anti-tavşan	αSMA anti-fare, Kol tip I anti-fare	keçi anti-tavşan ALP, eşek anti-tavşan TRITC	keçi anti-fare peroksidaz, keçi anti-fare FITC
αSMA anti-fare	vWB anti-tavşan	keçi anti-fare peroksidaz	keçi anti-fare FITC, keçi anti-fare peroksidaz
Kol tip I anti-fare	vWB anti-tavşan	keçi anti-fare peroksidaz, keçi anti-fare FITC	eşek anti-tavşan TRITC, keçi anti-tavşan ALP

### 3.2.9.2. Histolojik karakterizasyon

#### Vasküler greftlerin trikromla boyanması

Dokuların bulunduğu lamalar ikişer kez ksilolde 10-15 dakika, ikişer kez % 96'lık, alkolde 10 dakika, birer kez % 80'lik alkolde 10 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra distile suyla iyice yıkanmış ve Bouin solusyonuyla (75 mL pikrik asit, 25 mL % 37-40'lık paraformaldehit ve 5 mL glasiyal asetik asit) 56<sup>0</sup>C'de etüvde 1 saat tutulmuştur. Bu süre sonunda örnekler çeşme suyuyla yıkanmış, 20 dakika hematoksilende çekirdekleri boyanmıştır. Tekrar çeşme suyuyla yıkanan örnekler asit alkolden geçirilmiş, tekrar yıkanmış, amonyaklı sudan geçirilmiş, tekrar yıkanmış ve trikrom boyasında 15-20 dakika tutulmuştur. 2 dakika % 0.5'lik asetik asitte tutulan örnekler ikişer kez alkolden geçirilmiş, ksilolde tutulup kapatılmıştır.

#### Vasküler greftlerin Verhoeff van Gieson'la boyanması

Hematoksilen, ferik klorür ve iyodin solusyonuyla hazırlanan Verhoeff (elastik doku boyası), sulu asid fuksin ve satüre sulu pikrik asitle hazırlanan van Gieson boyasıyla damarlardaki elastik fiberlerin varlığı saptanmıştır.

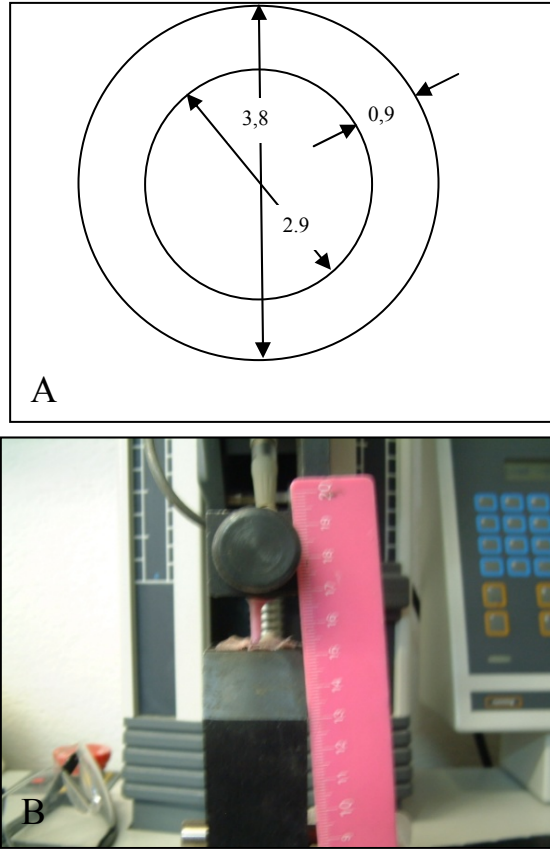
Önce ksilolde, sonra sırasıyla % 100'lük alkol, % 95'lik alkol ve distile suda bekletilen doku kesitleri Verhoeff solusyonunda 15 dakika tutulmuş ve tekrar distile su ile yıkanmıştır. % 2'lik ferik klorürle diferansiye edilen kesitler 1 dakika % 5'lik sodyum tiyosülfatta bekletilmiş ve 5 dakika musluk suyunda yıkanmıştır. Van Gieson'da 1 dakika tutulan kesitler en son % 95'lik alkolde diferansiye edilmiş ve sırasıyla iki kez % 100'lük alkolde ve iki kez ksilolde bekletilmiş ve sonunda üzerleri lamelle kapatılmıştır.

### 3.2.9.3. Vasküler greftlerin mekanik karakterizasyonu

Biyoreaktörde inkübe edilen 12 haftalık TEVG mekanik teste uygun şekilde kesilerek hazırlanmıştır. Mekanik test için kesilen TEVG'in boyut ölçümleri Şekil 3.4'deki gibi yapılmıştır. TEVG'nin mekanik testi kurummasını engelleyecek tedbirler

alınarak (ıslak olarak) oda sıcaklığında Lloyd LRX5K model (Lloyd Instrument Limited, Birleşik Krallık) mekanik test cihazı ile yapılmıştır. Kuvvet sensörü olarak 100 Newton'luk yükleme hücresi kullanılmıştır. TEVG; test cihazının çekme çenelerine uygun şekilde tutturulduktan sonra çene aralığı 18 mm olarak ölçülmüştür. Dakikada % 100 gerinim için 18 mm/dk hızda çekme testi uygulanmıştır.

Mekanik test sonucu elde edilen grafikte orijinalinde kuvvet (Newton) olan "y" eksenini kuvvet değil Megapascal değerinden stres (N/mm<sup>2</sup>) olarak yeniden düzenlenmiştir. Aynı grafikte orijinalinde uzama (mm) olan "x" eksenini de uzama değil % değerinden gerinim ( $\Delta L/L_0$ ) olarak yeniden düzenlenmiştir.



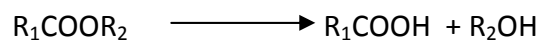
**Şekil 3.4.** TEVG'nin mekanik analizi. A) Boyut ölçümleri, kesit alanı (mm<sup>2</sup>):  $\pi[(\text{dış çap}/2)^2 - (\text{iç çap}/2)^2]$ . B) Greftlerin mekanik testi.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. PGA Meşlerin Yüzey Modifikasyonu

Vasküler doku mühendisliği alanındaki hücre taşıyıcı sistemler incelendiğinde kollajen, poli-4-hidroksibütirat (P4HB), polilaktik asit (PLA), poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), PGA, polihidroksialkonat ve bunların ko-polimerleri ve/veya kompozitleri değişik formları kullanılmaktadır (21,84). Bunlar arasında kollajen ve PGA öne çıkan malzemeler olmakla birlikte henüz bu alanda istenilen kriterleri taşımamaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi kollajenin mekanik olarak dayanımının az olması ve kültür ortamında büzülme sorunları nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Literatürdeki gelişmeler incelendiğinde (bakınız Bölüm 2.4) mekanik dayanıklılık ve suture özelliklerinin kritik önem taşıdığı vasküler greftler, PGA fiberler kullanılarak elde edilenlerdir. PGA doku mühendisliği alanında, FDA tarafından onaylı olması, biyobozunur olması, doku mühendisliğine yönelik fiberler halinde üretilmiş olması, yüksek gözenek yapısına sahip olması (% 98) ve kolay şekil alması gibi iyi özelliklere sahiptirler. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda 1mm kalınlığında, 45 mg/mL yoğunluğunda ve % 97 boş hacme sahip ticari olarak elde edilen PGA meşler kullanılmıştır. Ancak PGA bu iyi özelliklerinin yanında hidrofobik olmaları dolayısıyla SMC ve EC'lerin kolay tutunmaları ve hızlı çoğalabilmeleri için yüzey özelliklerinin modifiye edilmeleri gerekmektedir.

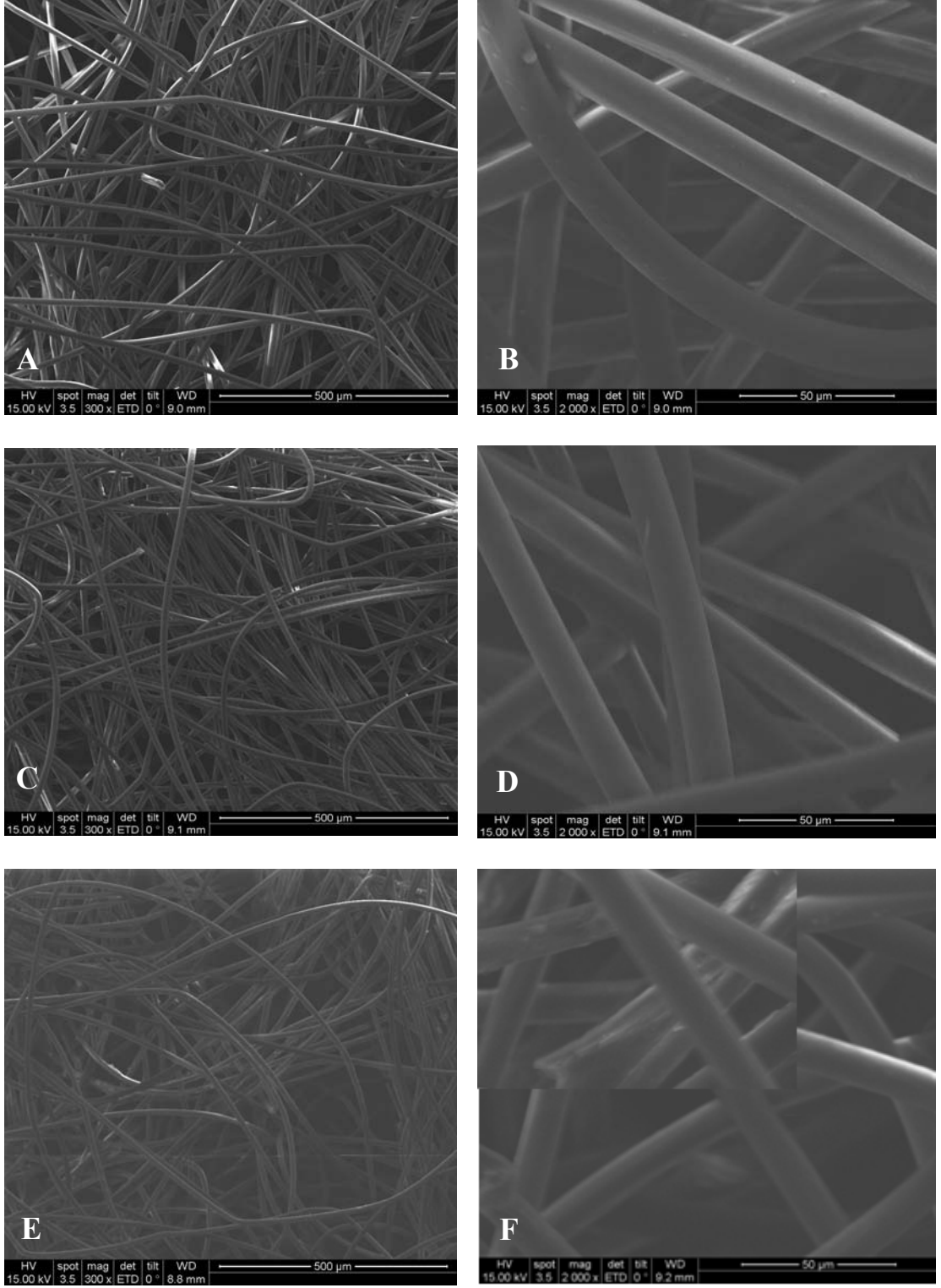
Bu nedenle çalışmamızda PGA meşlerin yüzey hidrofiliğini arttırmak amacıyla meşler NaOH ile 1 dakika ve 3 dakika olmak üzere tepkimeye sokularak, yüzeydeki ester gruplarının hidrolize uğrayarak karboksilik asit ve hidroksil gruplarına dönüşmesi sağlanmıştır.



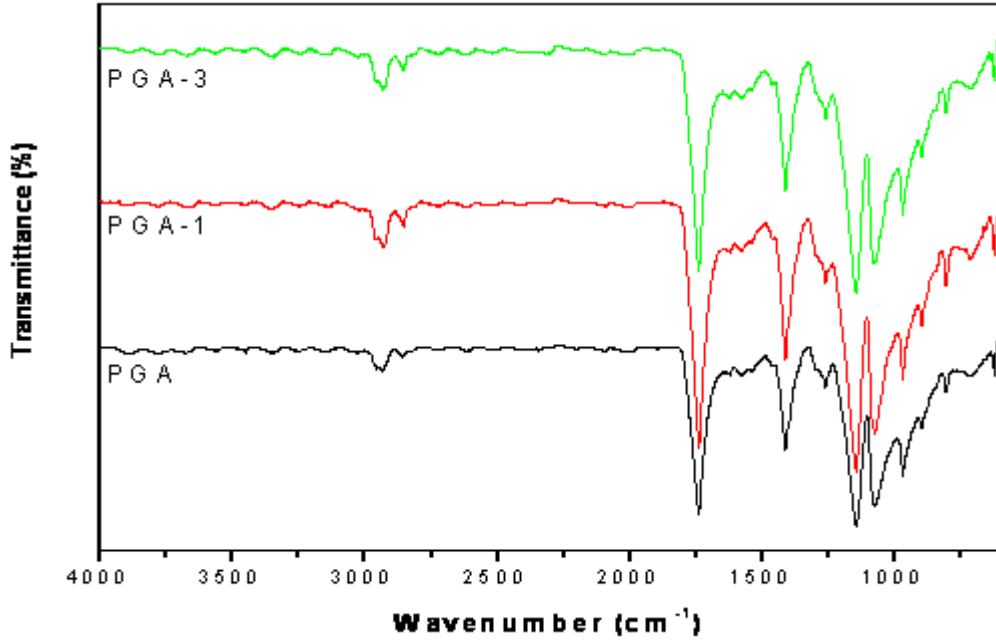
PGA meşlerin NaOH ile hidroliz sonucu yüzey morfolojilerindeki değişim SEM ile incelenmiştir. İşlem görmemiş PGA meşlerin çapları  $15.21 \pm 0.11 \mu\text{m}$  (n=6) olarak bulunmuş ve yüzeylerinin oldukça düzgün olduğu izlenmiştir (Şekil 4.1 A ve B). NaOH

ile 1 dakika muamele edilen PGA meş yüzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı izlenirken çaplarında ise minimal bir azalma ( $14.69 \pm 0.64 \mu\text{m}$  ( $n=6$ )) görülmüştür (Şekil 4.1 C ve D). Meşlerin NaOH ile 3 dakika muamele edilmesinin ardından çaplarının  $13.37 \pm 0.34 \mu\text{m}$  ( $n=6$ ) olduğu görülmüş ve bu çaptaki belirgin azalmanın yanında bazı meş yüzeylerinde hidroliz sonucu aşınmalar dikkat çekmiştir (Şekil 4.1 C ve D). Literatürde benzer şekilde PGA meşler NaOH ile farklı zamanlarda muamele edilerek, hidroliz zamanının etkisi incelenmiştir (85). 1 dakikanın sonunda PGA fiberlerin molekül ağırlıklarında, camsı geçiş ( $T_g$ ) ve erime ( $T_m$ ) sıcaklık değerlerinde bir değişim olmadığı saptanmış ve hidrolizin sadece fiberlerin yüzeyinde gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca NaOH ile muamele edilen yüzeylerin düz kas hücre tutunmalarını iki kat artırdığı yapılan ön çalışmalarımızla belirlenmiş olduğu için ileriki bölümlerde yapılan çalışmalarda tüm PGA meşler 1 dakika NaOH muamelesine tabi tutulmuştur.

PGA meşlerin kimyasal yapısı ATR-FTIR ile incelenmiştir. ATR-FTIR spektrumunda  $2934 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pik C-H gerilmesine ve  $1742 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, esterdeki C=O ve  $1630 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, C=O asetat uç gruplarına aittir. COO, CH ( $1415 \text{ cm}^{-1}$ 'de), esterdeki C-O ( $1230 \text{ cm}^{-1}$ ) ve C-OH uç gruplar ( $1078 \text{ cm}^{-1}$ ) spektrumdan izlenmektedir (Şekil 4.2). Bu pikler literatürde verilen PGA için verilen ATR-FTIR spektrumlarındakilerle örtüşmektedir (86). PGA meşlerin NaOH ile 1 dakika ve 3 dakika muameleleri sonunda alınan ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.2, PGA-1 ve PGA-3) ester grubuna ait C-O ve karbonil grubuna C=O gerilmelerine ait piklerde minimal azalmalar beklenirken bu izlenememiştir. PGA yüzeyindeki bu minimal değişimlerin ancak XPS ile yapılacak elemental karbon ve oksijen analizi ile daha isabetli olacağı düşünülmüştür.



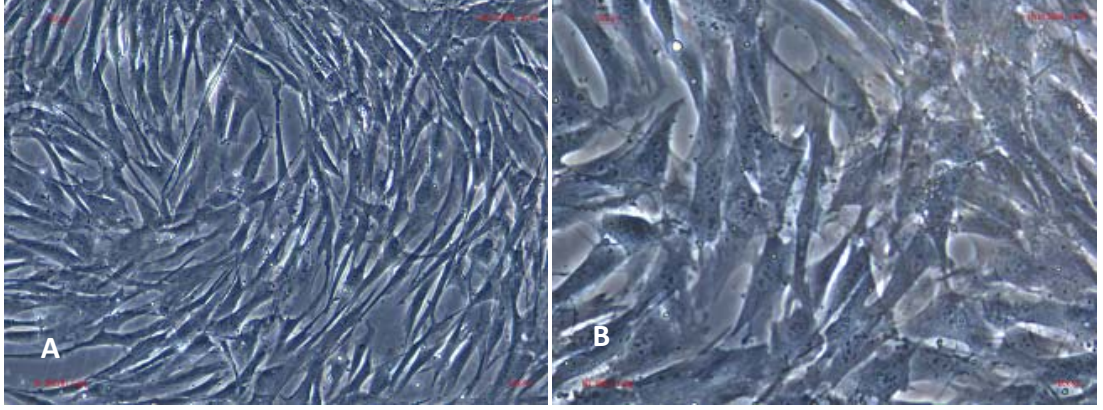
**Şekil 4.1.** SEM fotoğrafları. A, B) PGA meşler x300 ve x2000. C, D) NaOH modifiye PGA meşler (1 dakika muamele edilmiş) x300 ve x2000. E, F) NaOH modifiye PGA meşler (3 dakika muamele edilmiş) x300 ve x2000, (küçük resim x2000).



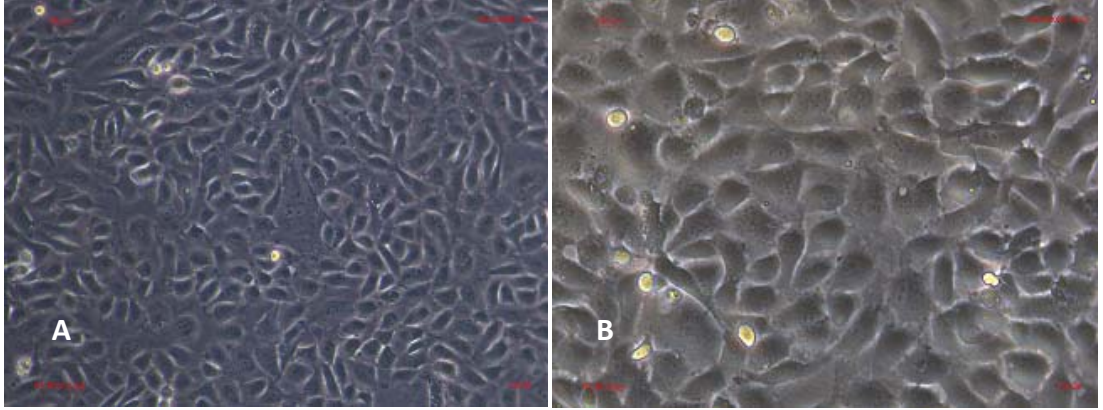
**Şekil 4.2.** PGA meşlerin ATR-FTIR Spekturumu (PGA, PGA-1:NaOH ile 1 dakika mumele edilmiş, PGA-3: NaOH ile 3 dakika muamele edilmiş).

#### 4.2. Hücrelerin Karakterizasyonu

Damar dokusunu oluşturmak için izole edilen ve belirlenen koşullarda çoğaltılan SMC ve EC'lerin fenotipleri ışık mikroskopu ile gözlenerek SMC'lerin fuziform ve EC'lerin kaldırım taşı (cobblestone) görünümünde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4). İleri karakterizasyon için özgül proteinlerin varlığı ise immunohistokimyasal metotlarda tespit edilmiştir.



**Şekil 4.3.** SMC'lerin mikroskopik görüntüsü, A) x10, B) x20.



**Şekil 4.4.** EC'lerin mikroskopik görüntüsü, A) x10, B) x20.

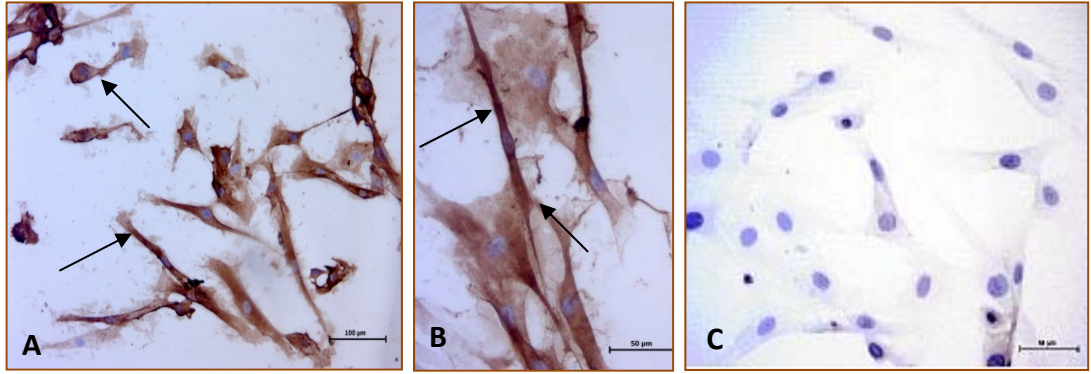
#### 4.2.1. Alfa-Düz Kas Aktin ( $\alpha$ -SMA) Filamentlerinin Varlığı

Fuziform biçimli düz kas hücrelerinin sitoplazmasında kasılmaya ilgili bir protein olan  $\alpha$ -düz kas aktin ( $\alpha$ -SMA) varlığı gözlenmiştir. Yaklaşık olarak sitoplazmanın tamamını dolduran filamentler kahverengi olarak boyanmıştır (Şekil 4.5 A ve B). Şekilde negatif kontrol primer antikor kullanılmadan sadece sekonder antikorla inkübasyon sonucunda elde edilmiştir (Şekil 4.5 C). Floresan işaretleme tekniğinde ise alfa düz kas aktin filamentlerinin varlığı sitoplazmada yeşil filamentler olarak belirgin bir şekilde izlenmiştir (Şekil 4.6). FITC işaretli düz kas aktinlerinin gözlenip, DAPI ile izlenen çekirdeğin görüntülenmediği filtre görüntüsü de alınmıştır (Şekil 4.6 B). Bu veriler ışığında hücrelerin vasküler düz kas olduğu ve alfa düz kas aktinleri salgıladıkları tespit edilmiştir.

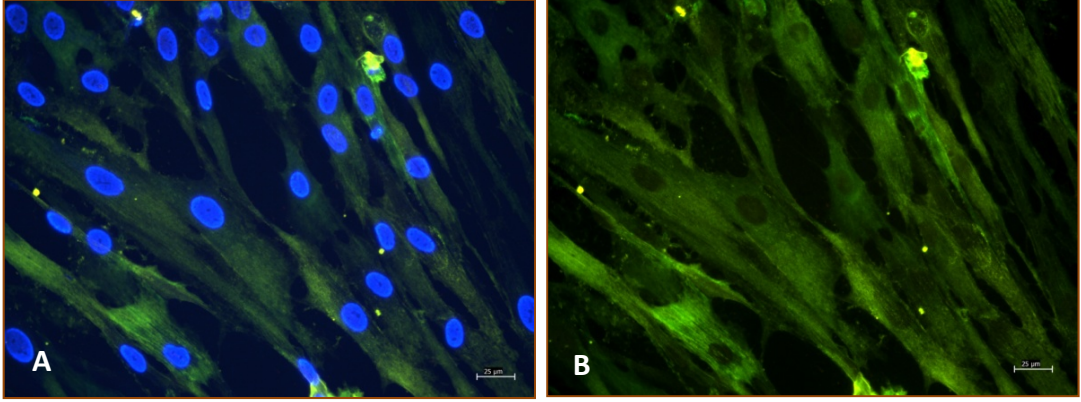
#### 4.2.2. Kalponin Ekspresyonu

Kalponin, aktin'e bağlanan ve düz kas hücrelerinin ince filamentlerinde bulunan bir proteindir (87). Miyozinin ATPaz aktivitesini inhibe eder ve  $Ca^{+2}$ 'a bağlı kasılmanın gerçekleşmesini sağlar (88).

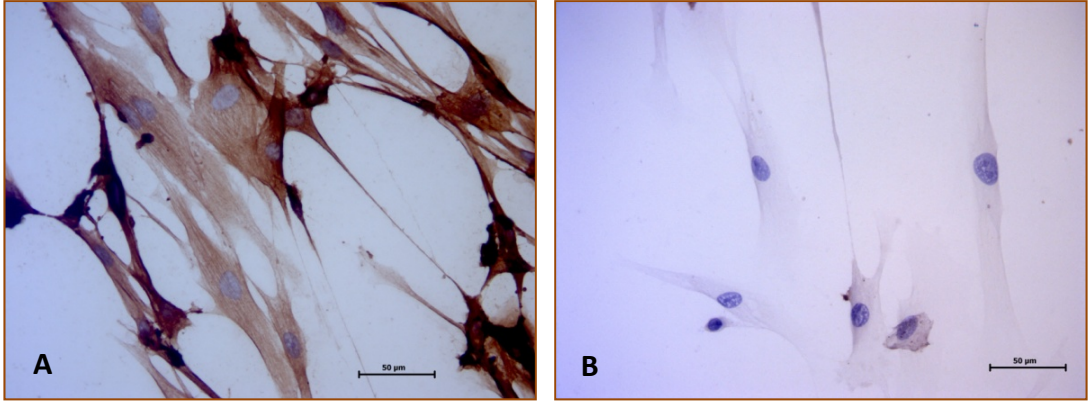
Kasılmayı sağlayan proteinlerden biri olan ve bu nedenle SMC'lerde eksprese edilen bu proteinin varlığı immunohistokimya tekniği ile yapılan boyamayla gösterilerek SMC'lerin karakterizasyonu yapılmıştır (Şekil 4.7). Kalponinin aktin filamentlerine bağlanması, aktin filamentlerinin de hücrelerin uzayarak yüzeye tutunmayı sağlayan uzantılarında yoğun olması tutunma nedeniyle kalponin ekspresyonu bu bölgelerde daha koyu renkli olarak izlenmektedir. Floresan tekniğiyle yapılan boyamalarda da hücrelerde yer yer lokalize belirgin kalponin boyanması izlenmiştir (Şekil 4.8). Bu incelemeler sonucunda damar düz kas hücrelerinde ifade edilen kalponin bu hücrelerin düz kas hücreleri olduğunu belirlemiştir.



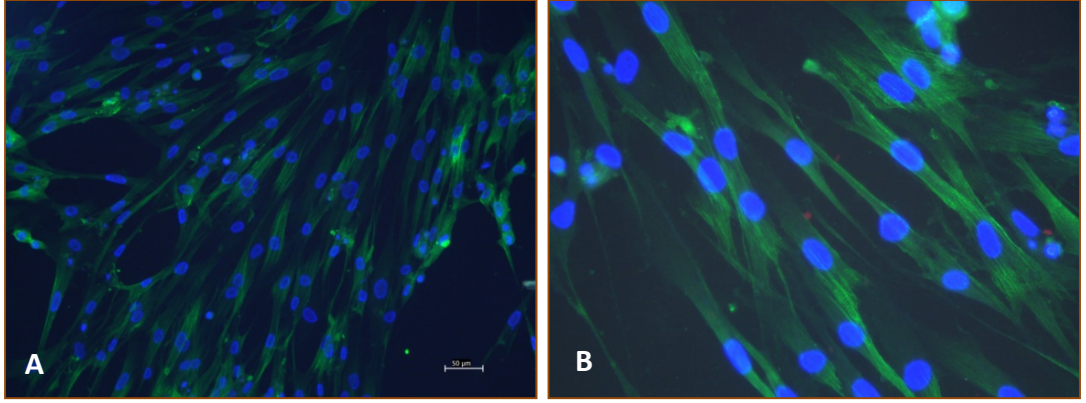
**Şekil 4.5.** Alfa düz kas aktin ekspresyonu. A ve B) İndirekt immunoperoksidaz tekniği ile  $\alpha$ -SMA (ok) pozitif vasküler düz kas hücreleri sitoplazmada kahverengi olarak izlenmektedir pasaj 4, x20, x40. C) Negatif kontrol. Hematoksilen çekirdek boyası, x40.



**Şekil 4.6.** Alfa düz kas aktin ekspresyonu. A) İndirekt immunofloresan tekniği ile FITC işaretli  $\alpha$ -SMA ekspresyonunu gösteren vasküler düz kas hücreleri, pasaj 4, x40. B) Çekirdek boyası DAPI eksite olmayan, I<sub>3</sub> filtre, DAPI çekirdek boyası, x40.



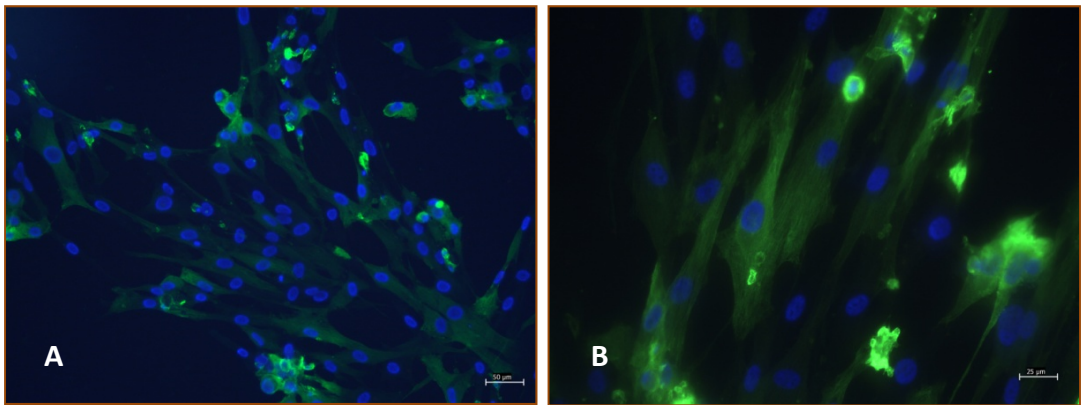
**Şekil 4.7.** Kalponin ekspresyonu. A) İndirekt immunoperoksidaz tekniği ile kalponin pozitif düz kas hücresi, kalponin sitoplazmada kahverengi olarak izlenmektedir, pasaj 4, hematoksilen çekirdek boyası, x40. B) İndirekt immunoperoksidaz tekniği ile negatif kontrol vasküler düz kas hücresi, pasaj 4. Hematoksilen çekirdek boyası, x40.



**Şekil 4.8.** Kalponin ekspresyonu. İndirekt immunofloresan tekniği ile FITC işaretli kalponin ekspresyonu gösteren vasküler düz kas hücreleri, pasaj 4. DAPI-çekirdek boyası, A) x20, B) x40.

#### 4.2.3. Miyozin Ağır Zincirlerin (MHC) Ekspresyonu

Düz kas hücrelerinde kasılmadan sorumlu bir diğer protein olan “miyozin ağır zincir”in, anti-MHC antikoruna ile yapılan işaretleme sonucunda sitoplazmik uzantıları ile tutunan fuziform hücrelerin sitoplazmasında oldukça yaygın immun işaretleme gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.9). Miyozin ağır zincirlerinin ekspresyonuna yönelik yapılan bu çalışmalar sonucunda hücrelerin damar düz kası özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir.

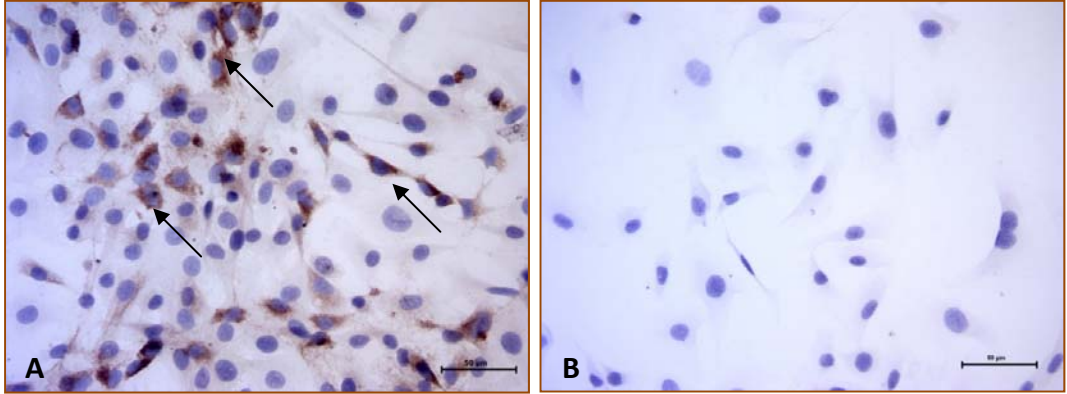


**Şekil 4.9.** Miyozin ağır zinciri ekspresyonu. İndirekt immunofloresan tekniği ile FITC işaretli anti-miyozin pozitif pasaj 4 vasküler düz kas hücreleri. DAPI çekirdek boyası, A) x20, B) x40.

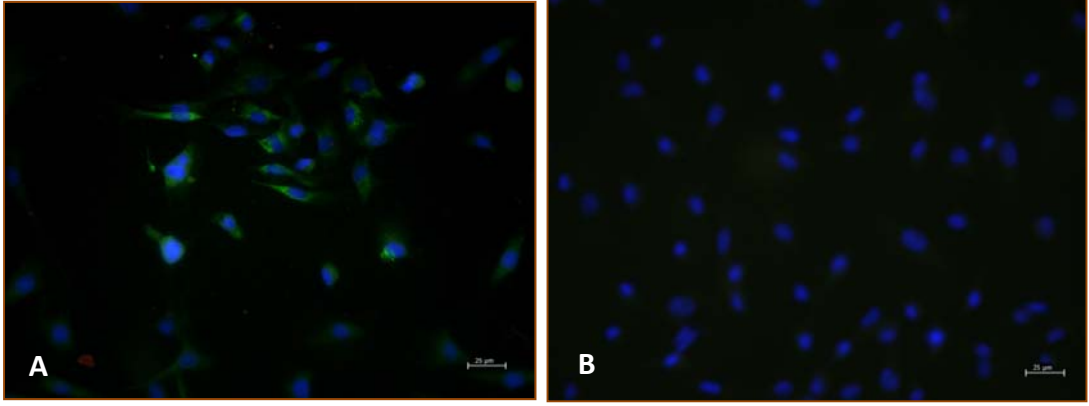
#### 4.2.4. von Willebrand Faktör (vWB) Ekspresyonu

Işık mikroskopunda yapılan incelemede sitoplazmik uzantılarıyla izlenen hücrelerin hematoksilin ile boyanmış çekirdeklerinin yanı sıra sitoplazma uzantılarında farklı yoğunlukta granüler özellikle peroksidaz ile işaretli von Willebrand vezikülleri görülmüştür (Şekil 4.10). von Willebrand faktör sentezi yapan bu hücreler endotel hücresi olarak tanımlanmış ve indirekt immunperoksidaz yöntemiyle sekonder kullanılmadan yapılan boyamayla da negatif görüntüleri alınmıştır.

von Willebrand faktör sentezinin immunofloresan işaretleme ile belirlenmesinde, floresan mikroskopunda I<sub>3</sub> filtrede eksite olan FITC işaretli von Willebrand faktör yeşil renkli görünümüyle sitoplazmik uzantılar içersinde ve A (UV) filtresi kullanılarak yapılan DAPI ile mavi boyanmış çekirdeklerin etrafında hücre sitoplazmasında farklı yoğunluklarda granüler şekilde görülmüştür (Şekil 4.11).



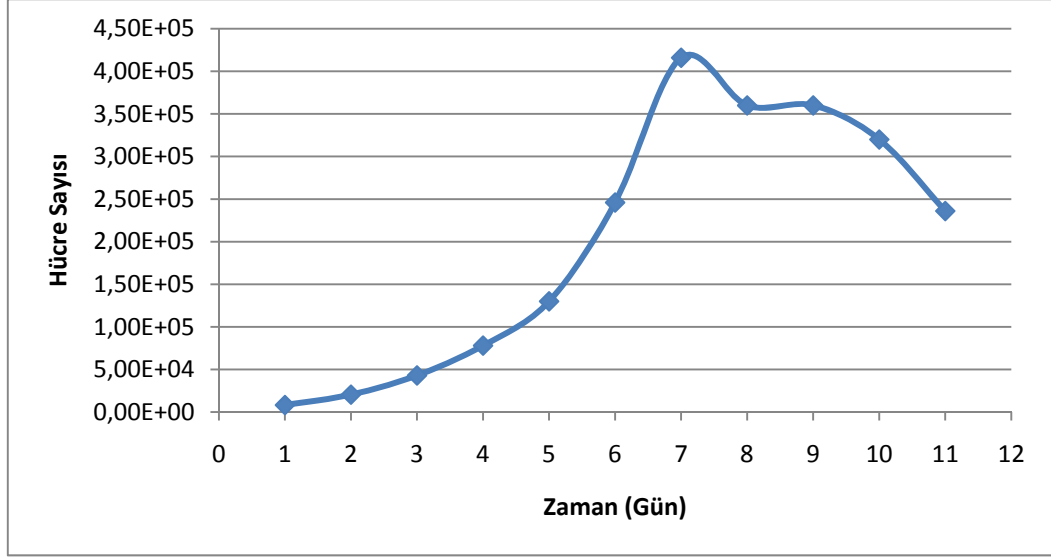
**Şekil 4.10.** von Willebrand faktör ekspresyonu. A) İndirekt immunperoksidaz tekniği ile vWB pozitif pasaj 4 endotel hücresi (ok), x40. B) İndirekt immunperoksidaz tekniği ile negatif kontrol, pasaj 4 endotel hücresi. Hematoksilin çekirdek boyası, x40.



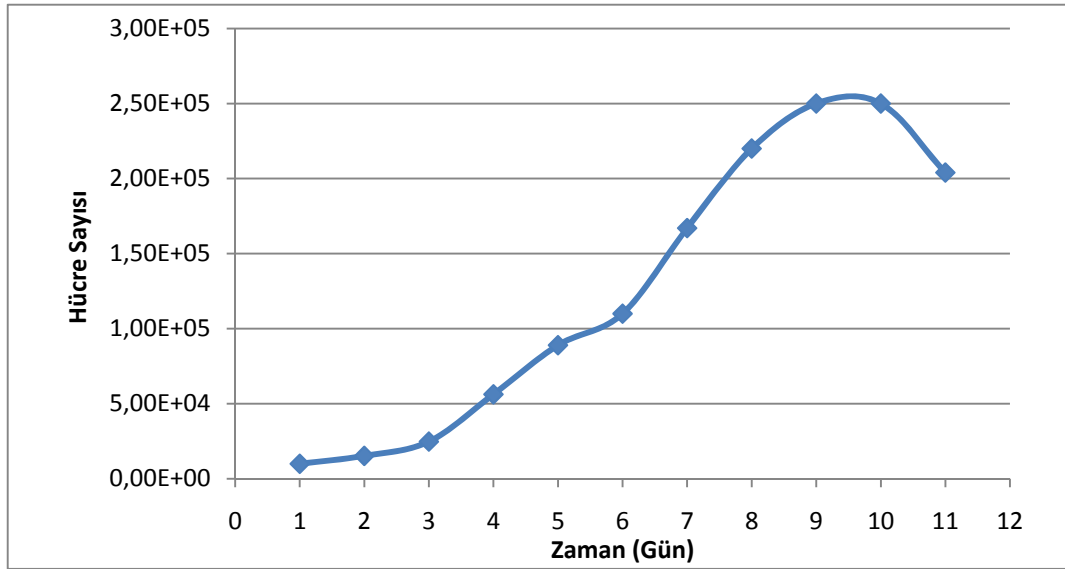
**Şekil 4.11.** von Willebrand faktör ekspresyonu. A) İndirekt immunofloresan tekniği ile FITC ile işaretli von Willbrand faktör pozitif pasaj 4 endotel hücresi, x40. B) İndirekt immunofloresan tekniği ile negatif kontrol pasaj 4. DAPI çekirdek boyası, x40.

### 4.3. SMC ve EC Hücrelerin Büyüme Eğrileri

Düz kas hücrelerinin (P/4) ve endotel hücrelerinin (P/4) çoğalma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.3.'de verildiği gibi standart kültür şartlarında büyüme eğrileri çalışılarak sırasıyla Şekil 4.12 ve 4.13 verilmiştir. Büyüme grafiklerinden de görüleceği gibi SMC'ler hemen eksponansiyel üreme aşamasına girmişler ve 8. günden itibaren hücre sayıları, hücrelerin kontakt inhibisyona girmesi ve ortamdaki hücresel atıkların varlığı nedeniyle azalmaya başlamıştır. Büyüme grafiklerinden SMC'ler için ikilenme süresi (d) 29 saat olarak bulunmuştur. Benzer şekilde P/4'de ekilen endotel hücrelerin büyüme grafikleri incelendiğinde, hücre sayılarının eksponansiyel olarak arttığı, 9. günden sonra ise kontakt inhibisyondan dolayı azalmaya başladığı gözlenmiştir. Bu hücrelerin düz kas hücrelerine göre daha yavaş çoğaldıkları izlenmiş ve ikilenme süresi 48 saat olarak bulunmuştur.



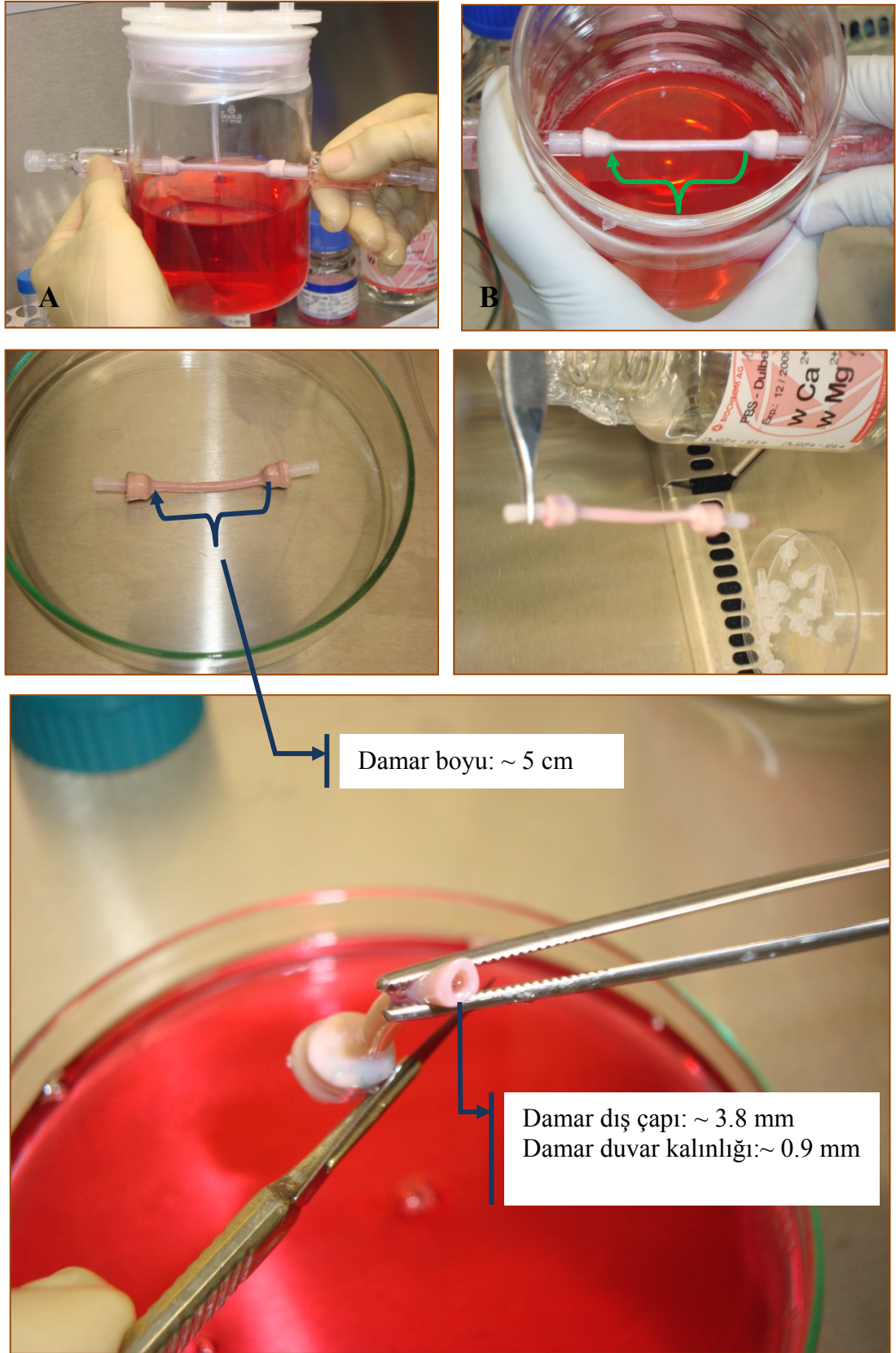
Şekil 4.12. Düz kas hücrelerinin büyüme eğrisi.



Şekil 4.13. Endotel hücrelerinin büyüme eğrisi.

#### 4.4. Doku Mühendisliği Vasküler Greftlerin Makroskopik Sonuçları

Damar dokusunun oluşumuna zamanın etkisini incelemek amacıyla 4, 6, 8 ve 12 haftalık olmak üzere farklı sürelerde inkübe edilen damar greftleri belirtilen sürelerin sonunda biyoreaktörden kesilerek alınmış ve incelenmiştir. İkinci haftadan sonra düz kas hücrelerinin PGA meşler üzerinde katmanlaştığı ve damar dokusunu oluşturmaya başladığı makroskopik olarak izlenmiştir. Ancak 4 ve 6 hafta sonunda çıkarılan damarların henüz olgunlaşmadığı ve yeterli duvar kalınlığına ulaşmadığı makroskopik olarak gözlenmiş, bununla beraber bu genç damarlarda düz kas hücreleri arasında oluşması beklenen bağlantı birimlerinin tamamlanarak daha sağlam ve daha sıkı düz kas tabakasının şekillenmesi için biraz daha zamana gereksinim olduğu düşünülmüştür. Ayrıca 4 ve 6 haftalık damarların henüz çok genç olması nedeniyle yeterli miktarda elastin ve kollajen gibi doku bütünlüğünü sağlayan hücrelerarası fibrilleri salgılayamadığı imminohistokimyasal olarak incelendiğinde saptanmış, bununla beraber ortamda hala PGA meşlerin varlığı gözlenmiş ve bu nedenle inkübasyon süresinin uzatılmasına karar verilmiştir. Literatürdeki bilgilere göre SMC'ler yüksek serum ortamında prolifer olma eğilimindeyken azalan serum miktarlarında durağan evreye girerek prolifer olmak yerine ekstraselüler matriks elemanlarını salgılamaktadırlar (60,89). Bu nedenle kollajen oluşumunu indüklemek için besi ortamındaki serum miktarının 6. haftadan sonra % 20'den FBS dereceli olarak % 1'e azaltılmasına karar verilmiştir. Aynı zamanda EC'lerin durağan evredeki SMC'ler üzerine daha iyi tutunup yayıldıkları ve tek sıralı bir tabaka oluşturdukları bilinmektedir (62). Bu durum da azalan serum miktarıyla birlikte EC'lerin ekimi sırasında daha uygun bir ortamın oluşturulması açısından avantaj sağlamaktadır. Bunun yanında ilk haftalarda SMC'lerin makroskopik olarak doku oluşturmaya başladığının gözlenmesinin sonucunda dokunun yavaş kalınlaşması üzerine her besiyeri değişiminde hücrelerin prolifer olmasını indükleyen PDGF'den (90) 50 ng reaktörlere eklenmiştir. Dokunun belli bir kalınlığa ulaşması sonucunda büyüme faktörü kesilmiş ve serum dereceli olarak azaltılmıştır. Bu şartlarda inşa edilen 12 haftalık TEVG'lerin görüntüleri Şekil 4.14'de verilmiştir.



**Şekil 4.14.** Doku Mühendisliği ile üretilmiş 12 haftalık damar örneği görüntüleri.

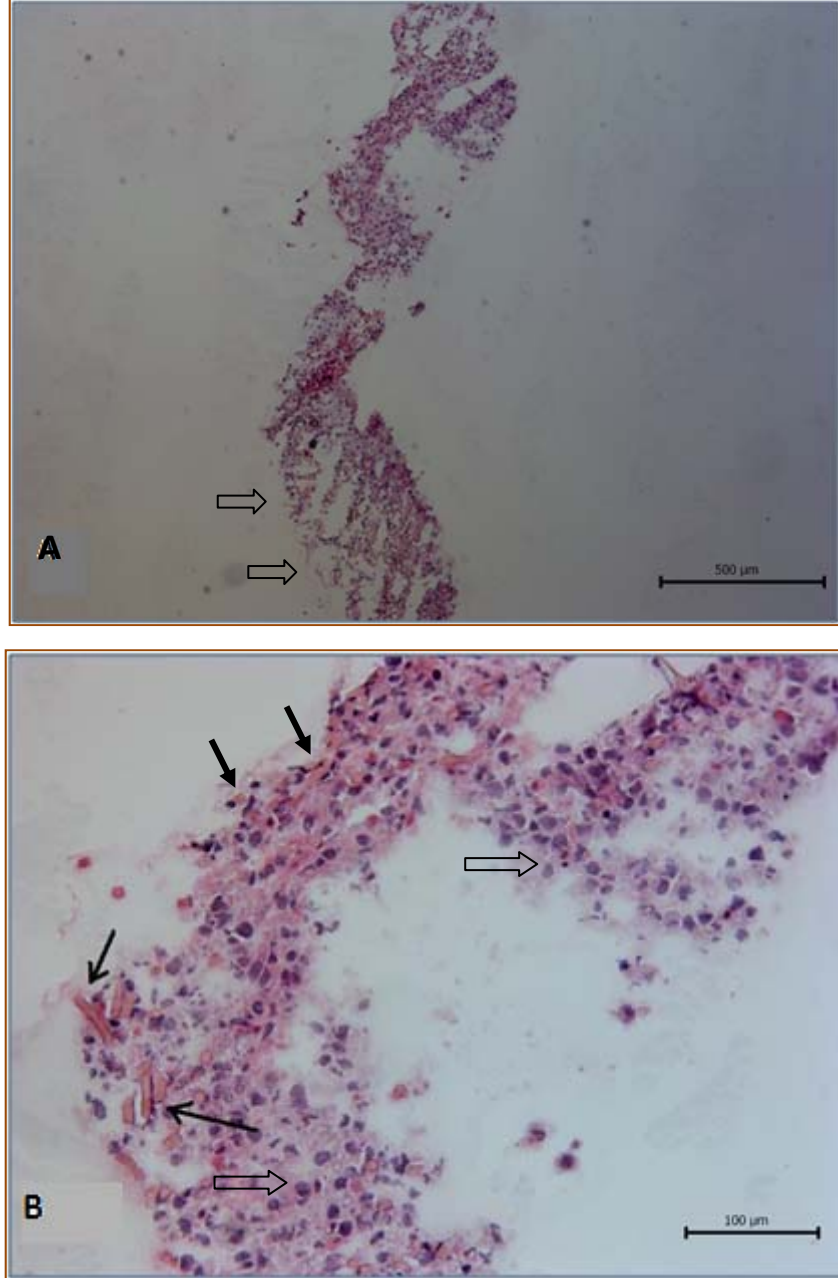
12 haftalık inkübasyon süresi sonunda elde edilen damarın morfolojisi tipik bir koroner arter benzeri olup, dış çapı 3.8 mm ve duvar kalınlığı ise 0.9 mm olarak ölçülmüştür. Damar yapısında PGA meşlerin kalmadığı ileriki bölümlerde verilecek immunohistokimyasal testler ile ispatlanmıştır. Kültür süresinin damar dokusunun oluşumuna etkisi, SMC'ler için alfa-düz kas aktinlerin varlığı, ekstraselüler matriks elemanı olarak kollajen çeşitleri, elastin varlığı ve endotelyumun oluşumu immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

#### **4.5. Doku Mühendisliği Vasküler Greftlerin İmmunhistokimyasal Özellikleri**

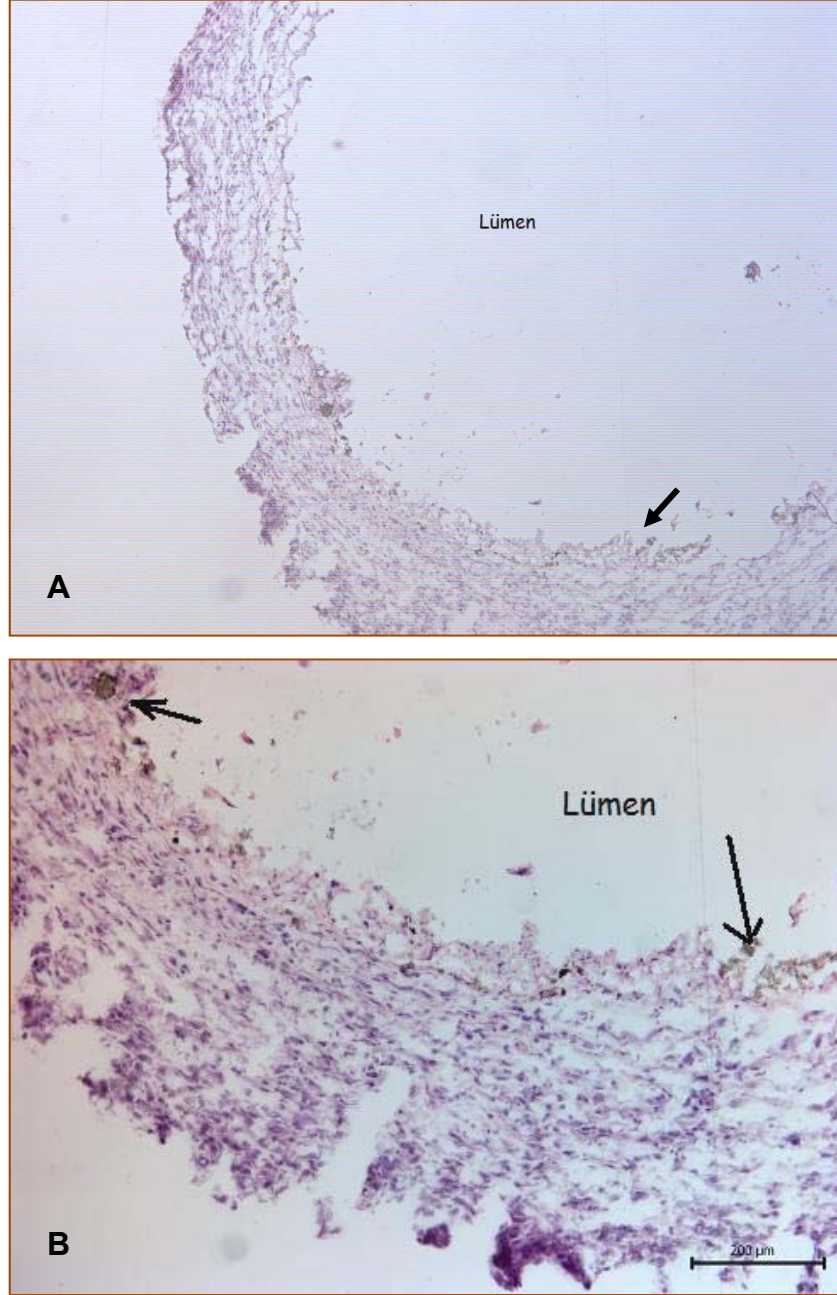
##### **4.5.1. Kültür Zamanının Damar Morfolojisine Etkisi**

4 ve 6 Haftalık TEVG örneklerin (Şekil 4.15-17) H&E boyamalarında damar dokusundaki hücre popülasyonunun lümen etrafında yoğun ve birbirleriyle yakın ilişkide çoğaldıkları izlenmiştir. 4 Haftalık damarlarda (Şekil 4.15) SMC'lerin morfolojik yapıları istenilen fuziform şeklinde olmamasına rağmen yan yana ve üst üste dizilimler oluşturması yapılanmanın başlangıç aşamasında olduğu izlenimini vermektedir. 4 haftalık damar henüz çok genç olduğu için kas dokusu çok ince olup kesit alma sırasında sorun yaşanarak duvar bütünlüğü bozulup, parçalanmıştır; dolayısıyla damar duvarını oluşturan düz kas hücreleri arasında yer yer boşluklar görülmektedir. Hücrelerin arasında parlak pembe renkli PGA meşlerin varlığı, bunların henüz tam olarak degradasyona uğramadığını göstermektedir. 6 haftalık damarların (Şekil 4.14 - 4.15) kesitlerinde ise SMC'lerin ince uzun fuziform biçimini almaya başladıkları gözlenmiştir. Lümen etrafında yan yana ve üst üste dizilmiş SMC'ler ortada yassı çekirdekleri ve yassılaştırmış fuziform biçimleri ile tabaka oluşturmaya başlamıştır. Hemen lümen kenarından biraz daha derinlerindeki düz kasların sıkıca paketlenmiş oldukları neredeyse bir tabaka düzenlenmesi gösterdikleri dikkat çekmektedir. Ancak damarın periferinde ise henüz tam sıkılaşmamış hücreler ve açıklıklar izlenmektedir. İç kısımda lümen komşu hücre aralarında ise parçalanmış ama henüz tam olarak absorblanmamış meşler okla gösterilmiştir. Bu damarda tabaka oluşturacak biçimde birbirine yaklaşmış ve

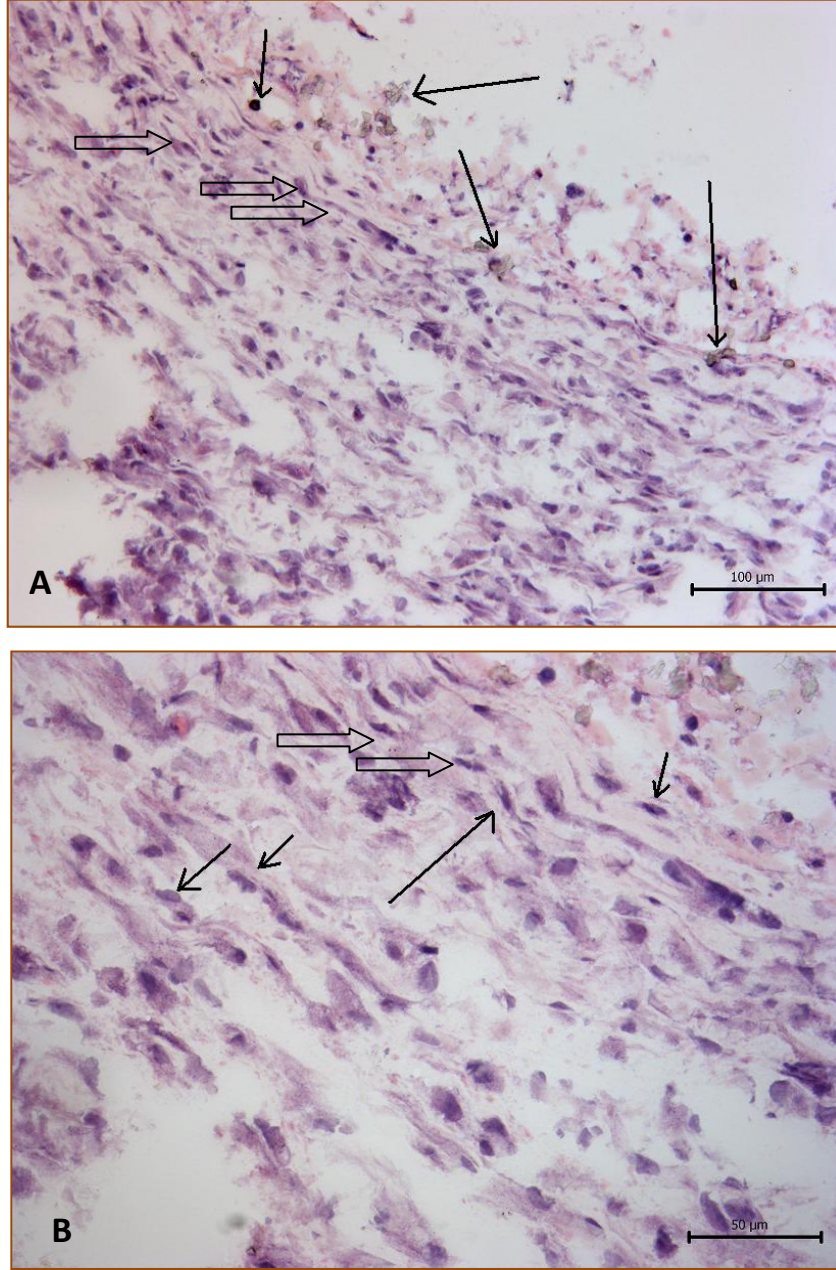
aralarında belki de bağlantı birimlerinin olduğu SMC'lerin kasılma gösteren hürelere benzer şekilde ince ve kıvrıktır. Periferdeki SMC'lerin de fuziform şekillerinde belirginleşme ve çekirdeklerinin uzamaya, oval biçim almaya başladıkları okla gösterilmiştir.



**Şekil 4.15.** 4 Haftalık damar örneğinde H&E boyaması. Açık renkli oklarla düz kas hücrelerinin çekirdekleri hematoxilen boyası ile koyu mavi, sitoplazmaları eozin ile pembe boyanmış olarak gösterilirken koyu renkli oklarla parçalanmamış PGA meş parçaları gösterilmektedir. Hematoxilen eozin boyaması, A) x5, B) x40.



**Şekil 4.16.** 6 Haftalık damar örneğinde H&E boyaması. PGA meş parçaları damar lümenine yakın, ok ile izlenmektedir, A) x5, B) x10.

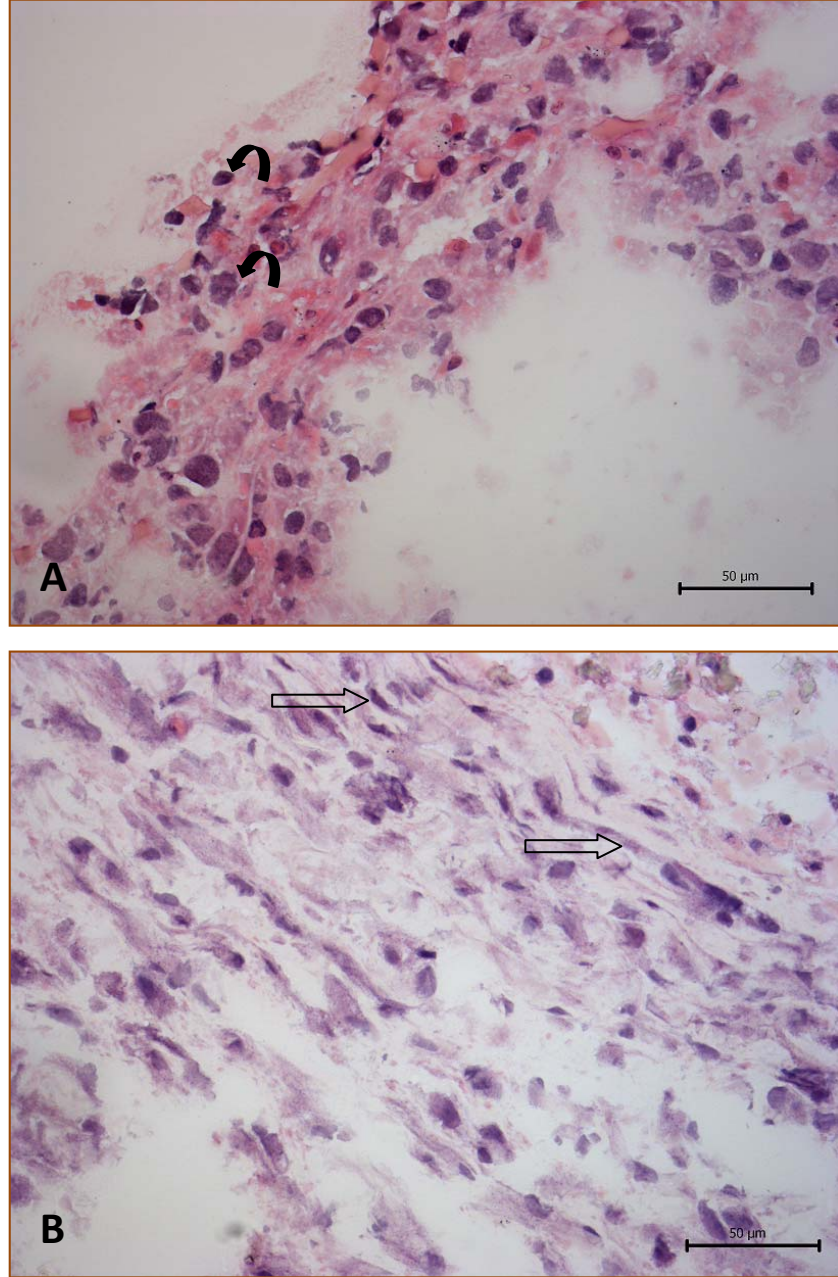


**Şekil 4.17.** 6 Haftalık damar örneğinde H&E boyaması (yüksek büyütme). A) Daha sıkı düzenlenmiş ve kasılma fenotipindeki düz kas hücreleri (açık renk ok) ve henüz absorblanmamış PGA meş parçaları (koyu renk ok). B) Oklar fuziform şeklini almış ve çekirdekleri uzamaya başlamış SMC'leri göstermektedir, A) x20, B) x40.

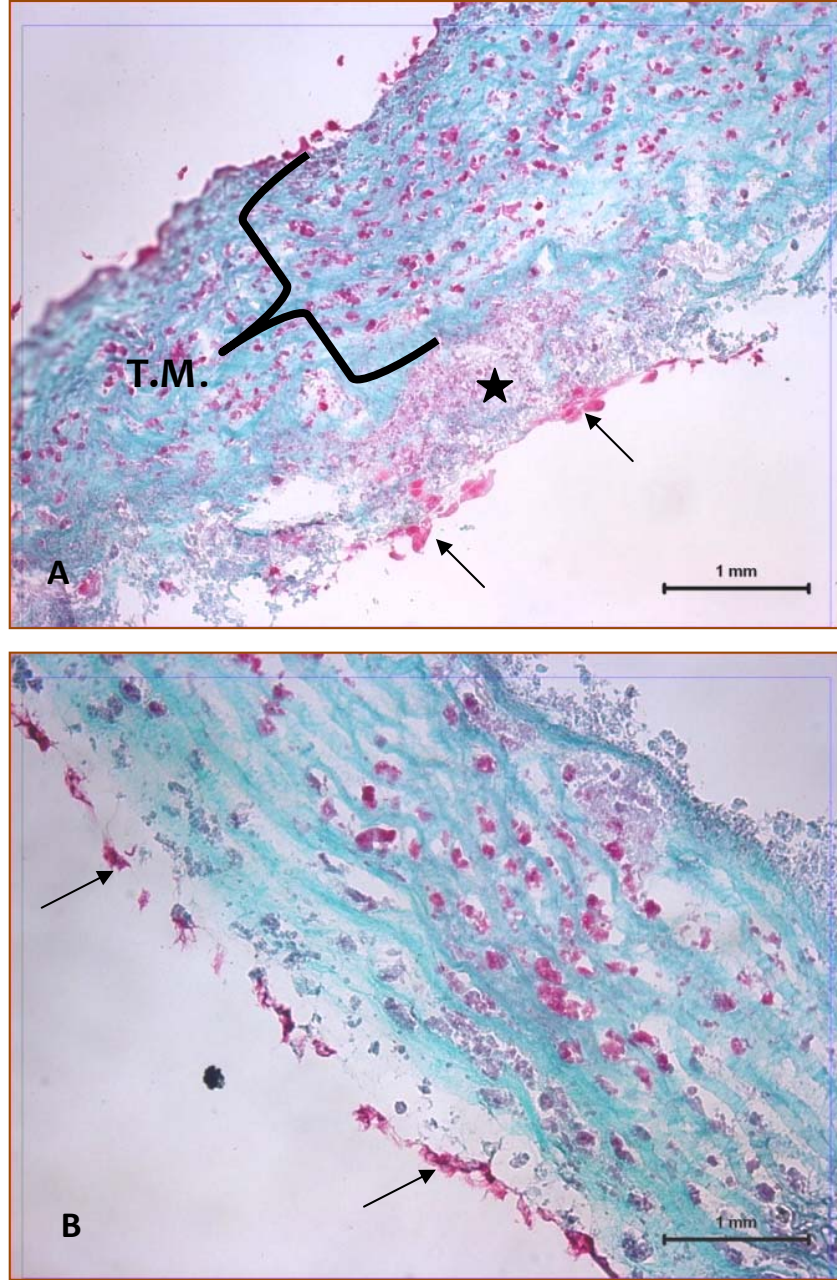
Damar örneklerinin 4 ve 6 haftalık yapıları karşılaştırıldığında (Şekil 4.18) 6 haftalık damarlarda daha sıkı ve düzenli bir doku olduğu ve hücre sayısının daha fazla olduğu gözlenmiştir. 4 haftalık damarlarda SMC'lerin yana ve üst üste dizilimler oluşturması yapılanmanın başlangıç aşamasında olduğu buna karşılık 6 haftalık damarların kesitlerinde SMC'lerin ince uzun fuziform biçimli oldukları ve kasılabilir duruma kısmen de olsa geldikleri izlenmiştir. Ancak hücrelerarası açıklıkların bulunması yeterli kollajen ve elastinin sentezlenmediği ve hücre sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 4 haftalık damar kesitinde PGA meşler daha çok izlenmekte olup, 6 haftalık damar kesitlerinde ise PGA meşlerin yerini hücrelerin aldığı ve bunların neredeyse kaybolduğu görülmektedir.

Bu bulgular doğrultusunda damar yapılanmasının olgunlaşması ve düz kas hücreleri arasında oluşması beklenen bağlantı birimlerinin tamamlanarak sağlam, yoğun ve sıkı düz kas tabakasının şekillenmesi için biraz daha zamana gereksinim olduğu düşünülmüştür. Ayrıca 4 ve 6 haftalık damarların henüz çok genç olması nedeniyle yeterli miktarda elastin ve kollajen gibi doku bütünlüğünü sağlayan hücrelerarası fibrilleri salgılayamadığı düşünülmektedir. Bu veriler doğrultusunda bundan sonraki damar dokularında biyoreaktörde inkübasyon süresi 8 ve 12 hafta tutulmuştur.

İnkübasyon süresinin 8 haftaya uzatılması sonucu damar kesitleri incelendiğinde belirginleşmiş bir orta tabaka (T.M.) ve bu geniş alanda mavi-yeşil renkli kollajen fibriller arasında düz kas hücrelerinin birbirlerine tutunarak tabakalanma gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.19). Şekil 4.1'da lümen yüzeyinde ekilen endotel hücreler belirgin olarak gözlenmektedir. Endotellerin üzerine ekildiği kollajen tabakası, tahminimizce miktarı fazla geldiği için ( $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) kalın bir katman halinde gözlenmektedir (Şekil 4.19 A).



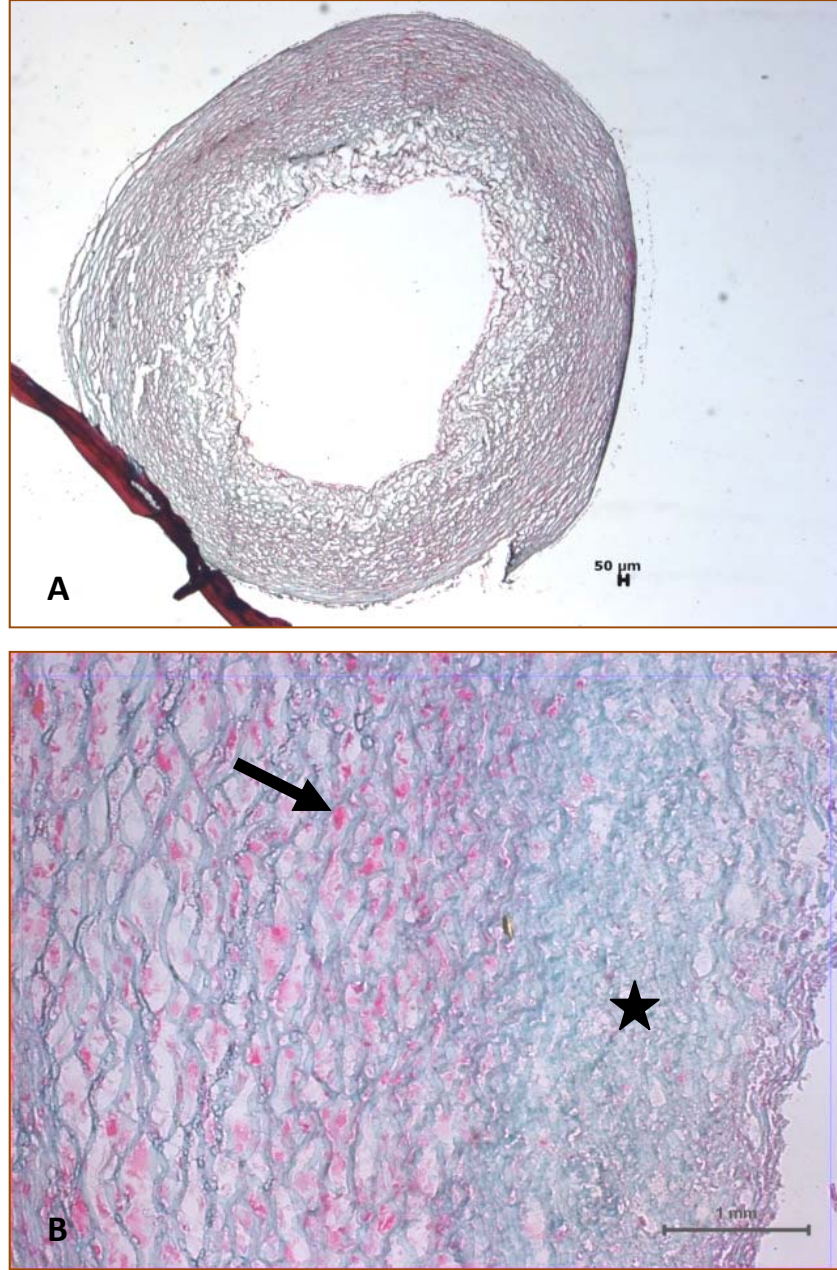
**Şekil 4.18.** A) 4 Haftalık ve B) 6 Haftalık damarların karşılaştırılması. Parçalanmamış PGA fiberleri (kıvrımlı ok) ve uzamış düz kas hücreleri (açık ok). Hematoksilen çekirdek boyaması, A) ve B) x40.



**Şekil 4.19.** 8 Haftalık damarda Masson's trikrom boyaması. A) Damardan alınan enine kesitte endotelden oluşan iç tabaka, düz kas hücrelerinden oluşan orta tabaka (T.M.) ve kollajen tabakası olduğu düşünülen ve subendotelde yerleşmiş katman (yıldız), x20. B) düz kas hücrelerinin birbirlerine tutunarak tabakalanma gösterdiği ve okla gösterilen endotel hücre dizisi görülmektedir. Masson's trikrom, x40.

Genel bilgilerde bahsedildiği gibi kan damarının mekanik g¼c¼ temel olarak orta tabakadaki SMC'lerin kasılma yeteneklerine, kollajen (% 27- 40) ve elastin varlığına bağlıdır. Kollajen fiberleri gerilme direncinin sağlanmasında ana etkindir ve b¼ylelikle damarın patlamaya karşı olan yapısal b¼t¼nl¼đ¼n¼ sağlarlar. Kollajen fiberleri çapraz bağlar ile organize olduklarında damarın mekanik dayanımını artırırlar.

Bu nedenle çalışmalarımızda Vitamin C eklenmesi kollajen miktarını artırırken bakır iyonu ve aminoasitlerin eklenmesi çapraz bağ oluşumunu artırmaktadır. Diğer taraftan h¼crelerin daha çok kollajen sentezini ind¼klemesi için biyoreakt¼rde kullanılan besi ortamında serum miktarı, ink¼basyon s¼resi boyunca % 20'den % 1'e dereceli olarak d¼ř¼r¼lm¼řt¼r. Bu şartlarda hazırlanan damar ¼rneđi canlı damar morfolojisine çok benzer bir g¼r¼n¼me sahip olduğu şekil 4.20'de g¼r¼lmektedir. 0.9 mm duvar kalınlığında olan damarın histolojisi incelendiğinde; yoğun ve kalın kollajen fibrillerden oluşan belirgin ve kalın bir orta tabaka ve yine bu tabakada fibriller arasında konumlanmış d¼z kas h¼creleri açıkça g¼r¼lmektedir.

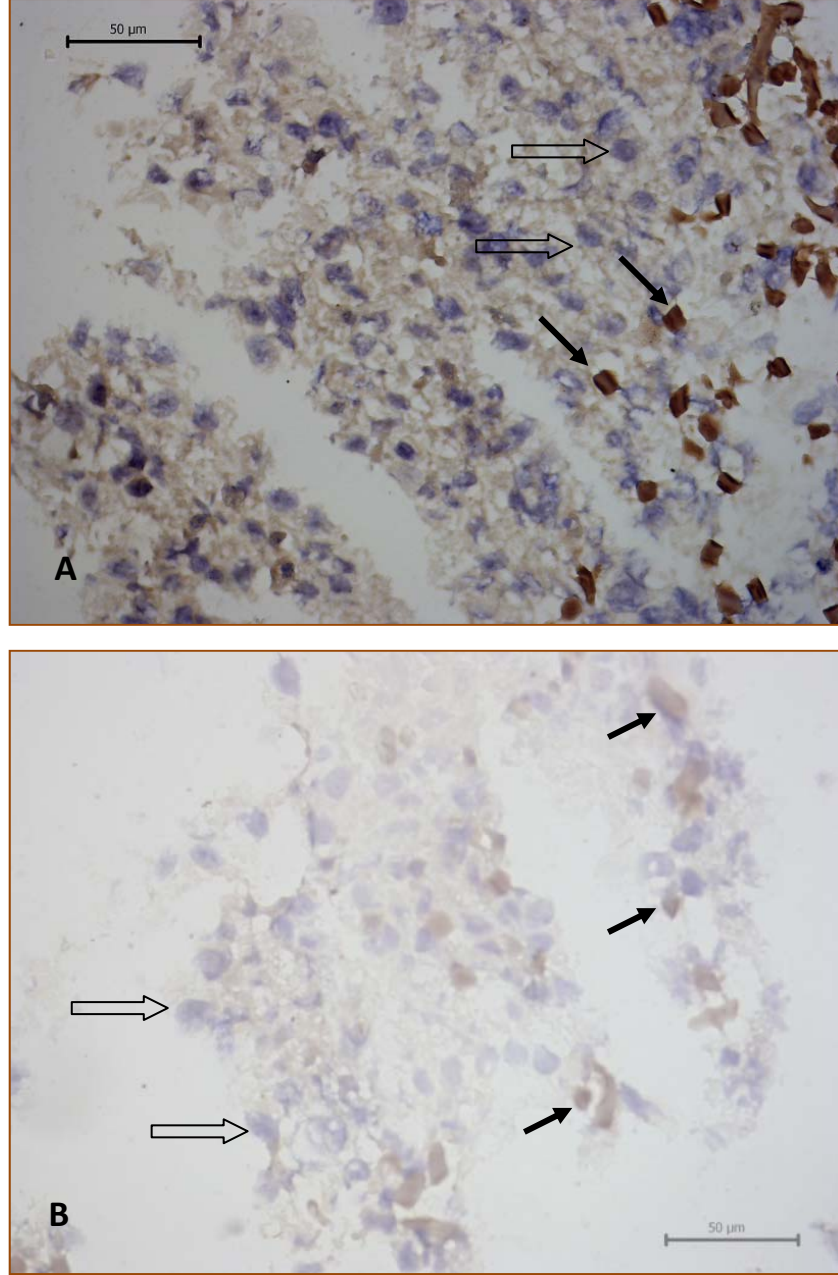


**Şekil 4.20.** 12 Haftalık damarda Masson's trikrom boyaması. Kalın bir tabakalanma gösteren düz kas hücrelerinin kırmızı çekirdekleri (koyu ok) ve mavi-yeşil renkli kollajen olduğu düşünülen tabaka (yıldız) görülmektedir. Masson's trikrom, A) x2.5, B) x20).

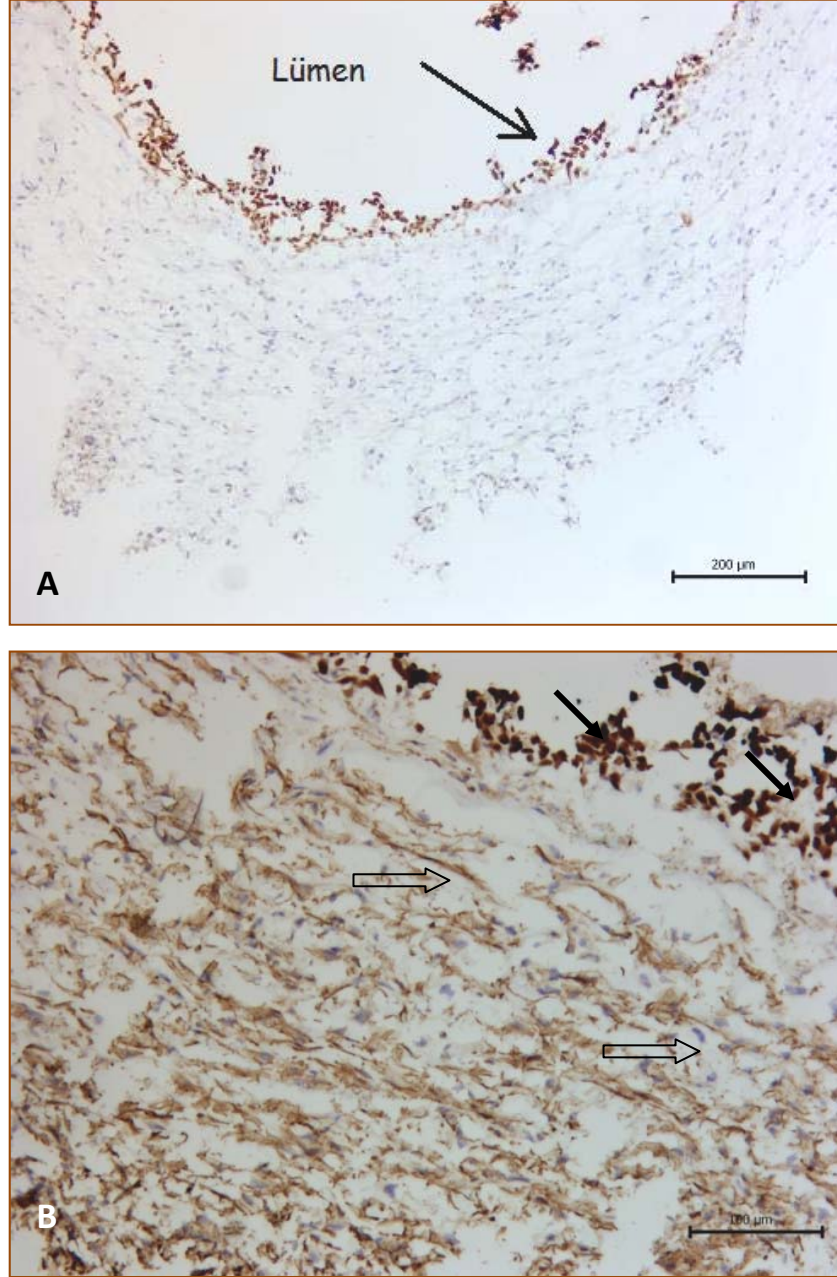
#### 4.5.2. Alfa-Düz Kas Aktin Sentezi

$\alpha$ SMA, aktin proteinlerinin içinde vasküler düz kas hücrelerinde ağırlıklı olarak bulunan bir aktin izoformudur (91). Diğer organların düz kas hücrelerinde  $\gamma$ -aktin ağırlıklı olarak bulunurken vasküler düz kas hücrelerinde ve perisitlerde  $\alpha$ SMA'nin bulunması bu hücrelerin farklılaşması ve kan damarlarının patolojik hastalıklarında rolü olduğunu düşündürmüştür (92). Stroma hücrelerinde  $\alpha$ SMA'nin yoğun olarak bulunması ve bu hücreler farklılaşırken vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşma yolunu izlemesi de bu görüşü desteklemektedir (93).

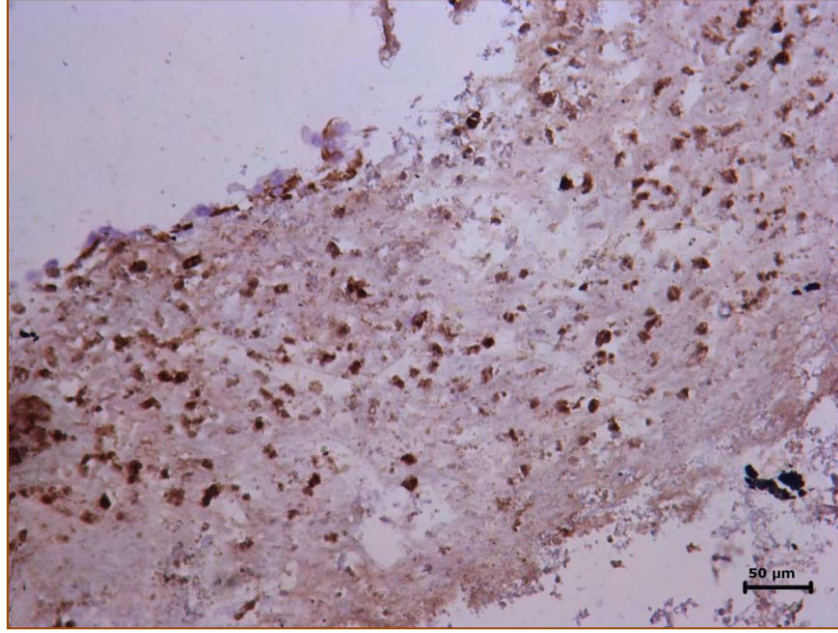
Bu nedenle farklı kültür zamanlarındaki damar yapılarında  $\alpha$ SMA'nin varlığı ve yoğunluğu gözlenmiştir. Orta tabakanın kasılabilir özellikteki düz kas hücrelerinin tüm damar yapılarında varlığı düz kas aktin sentezi ile gösterilmiştir (Şekil 4.21-25). 4 haftalık damar örneklerinde düz kas hücrelerinde alfa düz kas aktin sentezinin başlamış olduğu ama az şiddette immunreaktivite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.21). 6 haftalık damar kesitlerinde yer alan düz kas hücrelerinin alfa düz kas aktin immunreaktivitesinin daha şiddetli olduğu gözlenmiştir. 8 haftalık damar kesitlerinde  $\alpha$ SMA'nin daha yoğun boyandığı izlenmiş fakat en yoğun boyanmanın 12 haftalık damar kesitlerinde olduğu görülmüştür. Bunun sebebi hem hücre sayısının artmış olmasından dolayı daha yoğun boyanmanın görülmesi olabileceği gibi, SMC'lerin kasılır konumda olmasıyla bu proteinlerin ekspresyonunun daha yoğun gözlenmesi de beklenmektedir.



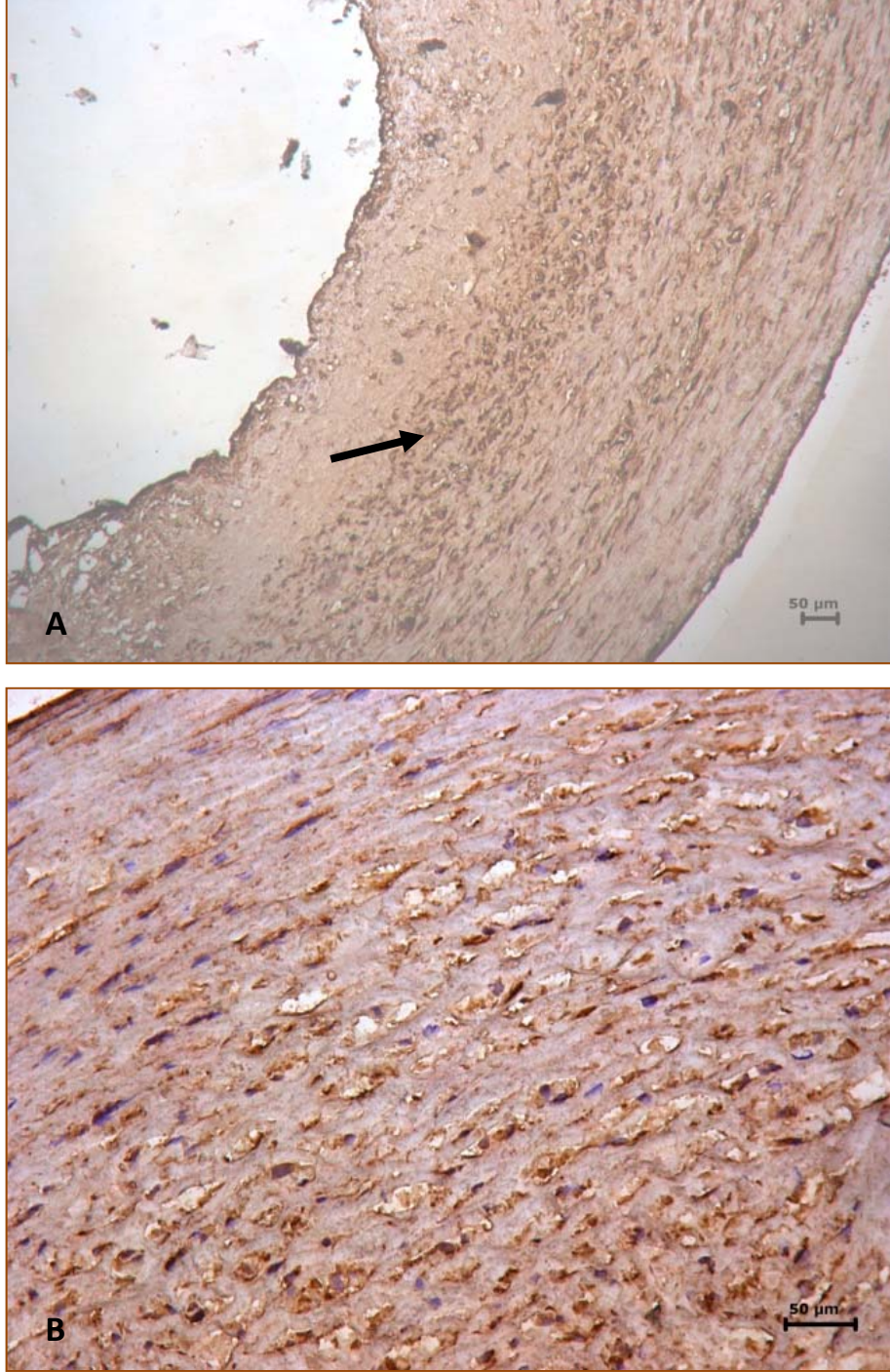
**Şekil 4.21.** 4 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu. A) 4 haftalık damarda lacivert-mor çekirdeklerin çevresinde pozitif reaksiyon gösteren sitoplazmik alfa düz kas aktin varlığı açık okla, parçalanmamış PGA meş parçaları koyu okla gösterilmiştir, hematoxilen çekirdek boyası, x40. B) 4 haftalık damarda alfa düz kas aktin için yapılan negatif kontrol. Koyu oklarla gösterilen PGA meş parçaları ve açık oklarla gösterilen hücre çekirdekleri gözlenmektedir,  $\alpha$ SMA, negatif kontrol. Hematoxilen çekirdek boyası, x40.



**Şekil 4.22.** 6 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu. A) 6 haftalık damarda alfa düz kas aktin boyaması negatif kontrolü. Lümeninde absorblanmamış PGA meş parçaları görülmektedir (koyu renkli ok), x10. B) 6 haftalık damarda alfa düz kas aktin boyaması. Lümeninde PGA meş parçaları (koyu renkli ok) ve düz kas hücrelerinin uzamış sitoplazmaları görülmektedir (açık renkli ok),  $\alpha$ -SMA, negatif kontrol. Hematoksilen çekirdek boyası, x20.

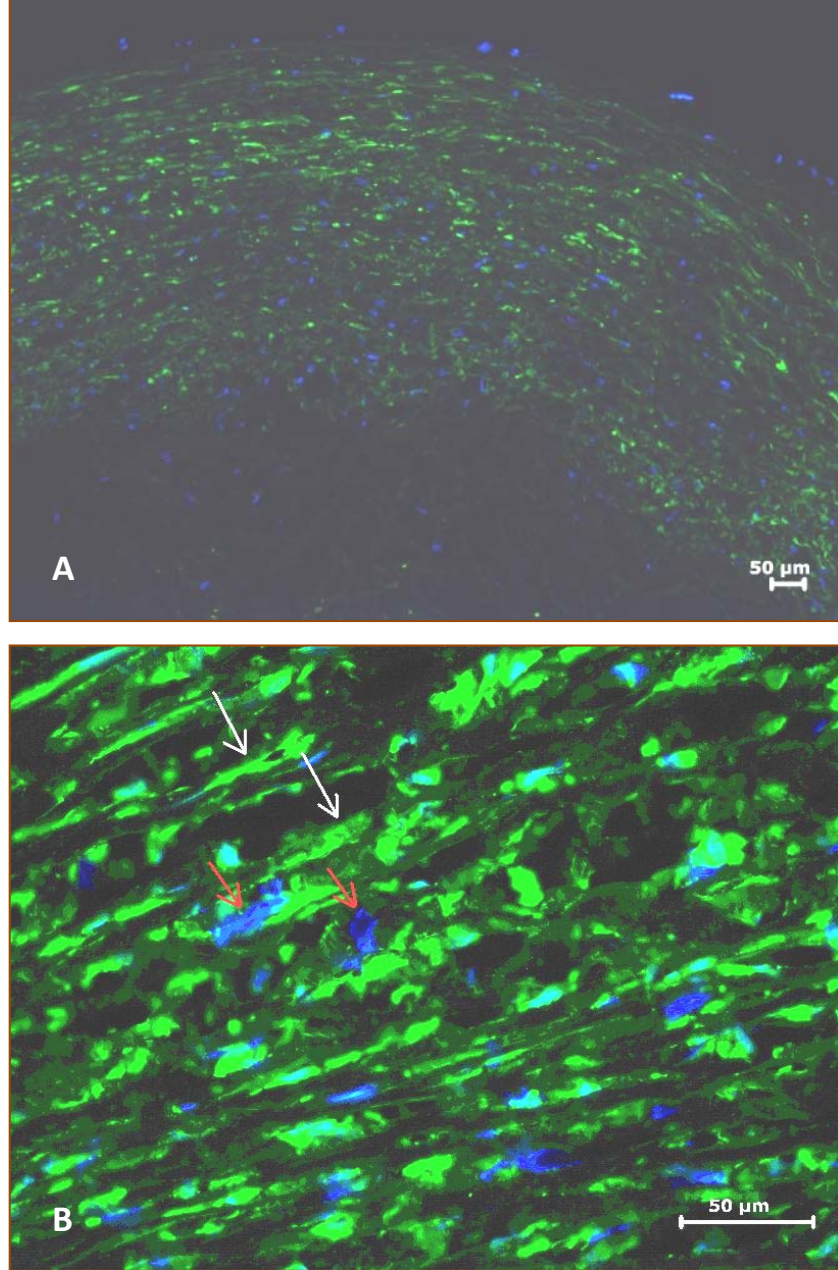


**Şekil 4.23.** 8 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu. Damardaki düz kas hücrelerinin alfa düz kas aktin immunreaksiyonu gözlenmektedir. Hematoksilen, indirekt immunoperoksidaz, x20.



**Şekil 4.24.** 12 Haftalık damarda alfa düz kas aktin ekspresyonu (peroksidaz). A) 12 Haftalık damar örneğinde gerçekleştirilen indirekt immunoperoksidaz ile boyanmış alfa düz kas aktin reaksiyonu (ok) izlenmektedir, x10. B) düz kas hücrelerinin oluşturduğu orta tabaka yüksek büyütmede görülmektedir. Hematoksilen, indirekt immunoperoksidaz, x20.

Düz kas hücrelerinin sitoplazmalarında İmmunofloresan tekniği kullanılarak yerleşmiş  $\alpha$ -SMC FITC işaretleme ile Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.25.** 12 Haftalık damarın alfa düz kas aktin ekspresyonu (floresan). A) 12 haftalık ve endotellerle 10 gün boyunca inkübe edilmiş damar örneğinin küçük büyütmede izlenen genel yapısı, x10. B) FITC ile işaretli alfa düz kas aktini işaretli düz kas hücreleri yeşil renkte (beyaz ok), DAPI çekirdek boyasıyla boyanmış çekirdekler de mavi renkte (kırmızı ok) izlenmektedir. DAPI, indirekt immunofloresan, x40.

### 4.5.3. Elastin Sentezi

Elastin, arter duvarının kuru ağırlığının yaklaşık % 50'si kadarını oluşturan en baskın ekstraselüler matriks elemanıdır (94). SMC'lerin tropoelastin monomeri olarak salgıladığı ve sonra bunların çapraz bağlarla elastini oluşturdukları bilinmektedir. Arterlerin orta tabakasındaki elastik lamelleri kasılabilir elastik halkalarla meydana getiren elastin hidrofobik, çözünür ve glikolize edilmemiş bir proteindir (95). Elastin damarların elastik karakterinden sorumludur, yük altında damarın zarar görmeden şekle girmesini ve yük kalkınca da eski haline dönmesini sağlar. Elastin sentezi, ECM'nin elastaz enzimi aracılığıyla parçalanmaya (degradasyona) uğramasından olumsuz yönde etkilenebilir, bu durum da ateroskleroz gibi hastalıkların ilerlemesinde önemli bir etmeni oluşturur (96). Elastin, damara esneklik sağlamanın yanında damar hücrelerinin düzenlenmesini ve işlevini de etkileyen etmenlerden birisidir. Yapılan bir çalışmada farelerde elastin geni bastırılmış ve fareler subendotel proliferasyonu ve düz kas hücrelerinin düzenlenmesinden kaynaklanan ateroskleroz sebebiyle ölmüşlerdir. Fakat elastin yokluğunun doğrudan inflamasyon ve pıhtı oluşumuyla ilgili olduğu düşünülmemektedir (97).

Yukarıda sayılan bu nedenlerle elastinin varlığı özellikle elastik arterler açısından oldukça önemli olmakla birlikte literatür kısmında verildiği gibi birçok TEVG'lerde elastine rastlanmamıştır. Sentetik doku iskelelerinde elastin biyosentezinin doku iskelesinin parçalanmasıyla meydana gelen atık moleküllerin (örn; glikolik asit), hücrelerin matriks proteinlerinin yapısını etkilediği düşünülmektedir. In vivo'da yürütülen bazı deneylerde bu greft yapılarının yeterli mekanik güce sahip olmasına rağmen bu greftlerde gözlenen kalıcı deformasyonun sebebinin, elastinin henüz çapraz bağlanarak organize bir yapı oluşturmadığı, bu nedenle elastik karakterin istenilen ölçüde olmadığı belirtilmiştir (95). Fakat bir damarın bütünlüğünün sağlanması açısından elastinin çapraz bağlanmasının önemi büyüktür. Bu nedenle çalışmamızda elastinin varlığının saptanması için Verhoeff boyaması yapılmıştır.

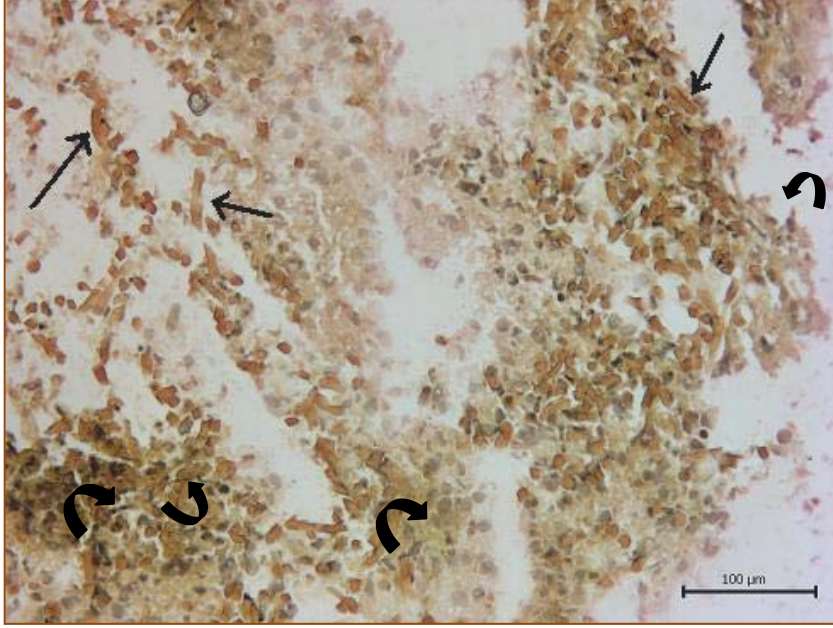
4 haftalık damar kesitlerinde elastin için yapılan Verhoeff boyamasında, kesit alırken parçalanmış düz kas dokusunda birbirinden ayrılmış hücre toplulukları ve boşluklar gözlenmiştir. Şekil 4.28'de eğri oklarla gösterilen ve elastin sentezinin başlamış olduğunu düşündüren ince ipliksi yapılar görülmüş ancak net olarak hücreler arasında uzun elastin fibrillerin varlığına rastlanmamıştır. Damarın henüz çok genç olması nedeniyle yeterli miktarda elastin ve kollajen gibi doku bütünlüğünü sağlayan hücrelerarası fibrilleri yeteri derecede salgılayamadığı düşünülmektedir. Bu nedenle henüz çapraz bağlanmamış elastin fiberlerinin ortamda mevcutsa bile yetersiz testler yüzünden saptanamamış olabileceği düşünülmektedir.

6 haftalık damarda, elastik lameller için yapılan Verhoeff boyamasında damar duvarını oluşturan düz kas hücreleri yer yer sıkıca paketlenmiş olarak izlenmektedir (Şekil 4.27). Ancak düz kas hücrelerinin henüz genç olması ve organizasyonunu tamamlamamış olması nedeniyle elastik lamellerin yapılıp izlenmemiştir. Hücrelerarası bağlantı birimleri de tüm tabaka boyunca oluşmamış olup hücre dizileri arasında yer yer boşluklar gözlenmektedir. Ancak açık oklarla gösterilen gruplarda hücrelerin birbirine sıkıca bağlanmış görüntüleri dikkat çekmektedir. Lümene yakın taraftaki hücrelerin arasında koyu renkle boyanmış ve parçalanmamış PGA meşler izlenmektedir.

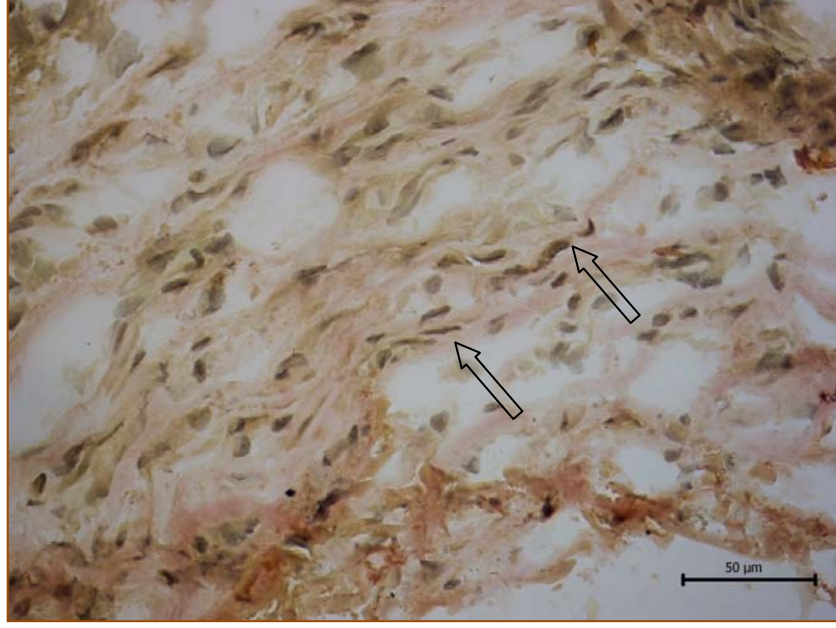
8 haftalık damar kesitinde Verhoeff van Gieson boyaması sonucunda okla gösterilen alanlarda düz kas hücreleri arasında ince kıvrımlı lacivert siyah renk elastin içeren fibrillerin varlığı izlenmiştir. 6 haftalık damarlarda bu şekilde uzun fibriler halde elastin görülmemesine karşın küçük, lacivert-siyah renkte görülen ve elastin sentezinin başladığını düşündürmektedir. İnkübasyon süresi arttıkça hem hücre sayısının hem hücreler arası bağlantıların artmasıyla daha sıkı bir tabakalanma gözlenmiş hem de 6 haftalık damarda başladığı düşünülen elastin sentezi, 8 haftalık damarda fibriler halde saptanmıştır (Şekil 4.28).

Elastin fiberlerin sentezinin moleküler yolları açıklandıkça bu sürecin daha karmaşık olduğu ve pek çok parametreden etkilendiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle elastin sentezinin moleküler seviyede incelenip değerlendirilmesi, kullanılan doku iskelelerinin yapısı, tropoelastin - reseptör ilişkileri ve kültürün dinamik koşullarda

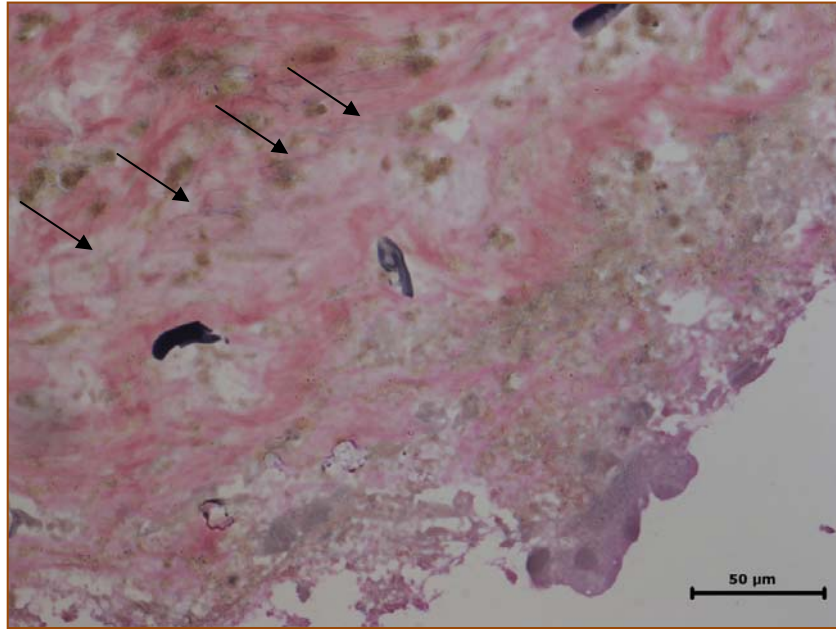
gerçekleştirilerek biyokimyasal sinyallerin artırılması üzerine daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Elastin fiberlerin çapraz bağlanmadan ortamda bulunabildiği göz önüne alındığında daha spesifik boyamaların yapılması bizlere damarın elastik karakteri hakkında daha ayrıntılı bilgi vereceği düşünülmektedir.



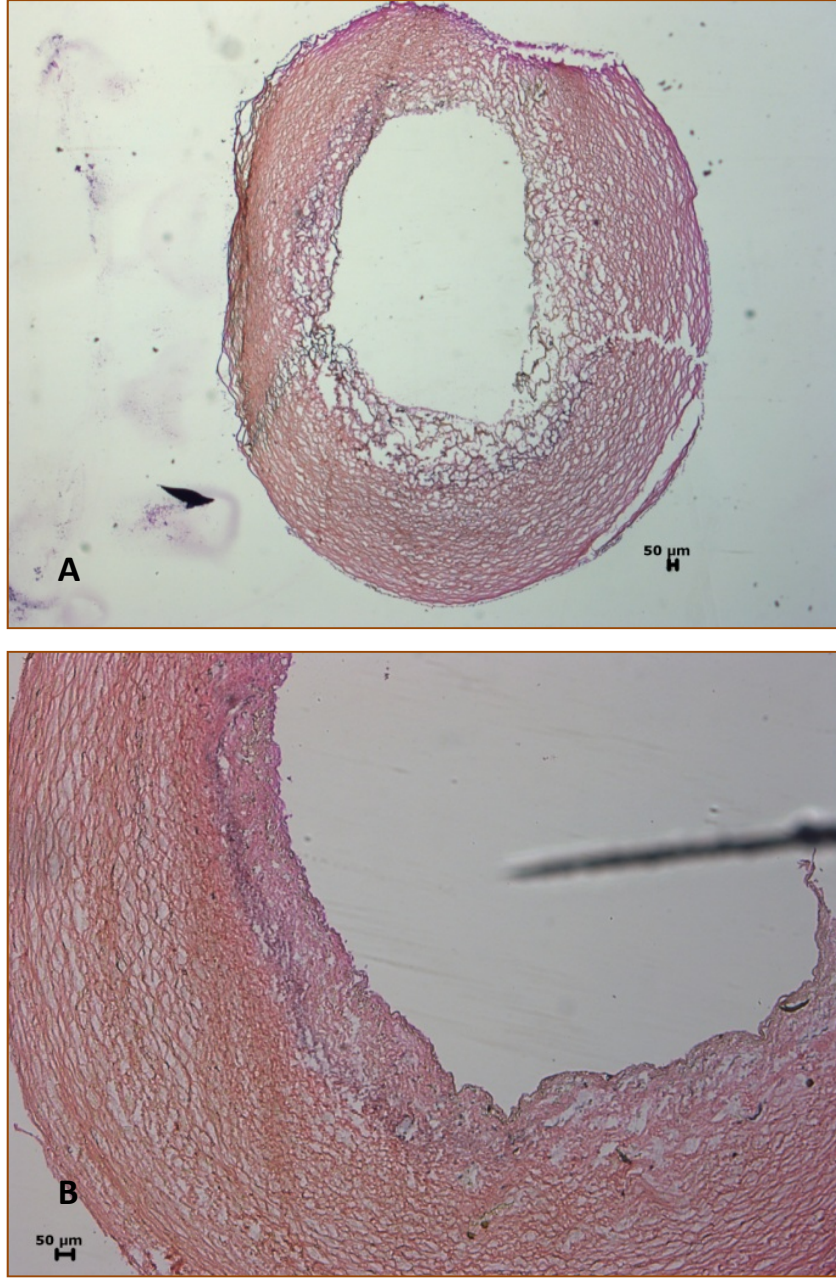
**Şekil 4.26.** 4 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması. Eğri oklarla gösterilen ve elastin sentezinin başlamış olduğunu düşündüren ince iplikli yapıları ve ok ile işaret edilen parlak kiremit kırmızısı-kahverengi bölgeler PGA fiberlerini göstermektedir. Verhoeff van Gieson, x20.



**Şekil 4.27.** 6 Haftalık damarda Verhoeff boyaması. Düz kas hücrelerinin ince, uzun ve fuziform yapıları çekirdeklerinin yer yer kasılabilen hücrelerin çekirdeğini hatırlatır biçimde ince sıkışmış kıvrımlı görünümleri izlenmektedir (açık ok). Ancak Verhoeff ile boyanmış belirgin elastik lameller görülmemiştir. Verhoeff van Gieson, x40.



**Şekil 4.28.** 8 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması. Okla gösterilen alanda düz kas hücreleri arasında ince kıvrımlı lacivert siyah renkli elastin fibriller izlenmektedir. Verhoeff van Gieson, x40.



**Şekil 4.29.** 12 Haftalık damar örneğinde Verhoeff boyaması. Endotellerle 10 gün boyunca inkübe edilmiş damar örneğinde verhoeff ile boyanmış damar kesitinde lümene komşu olan endotel tabakası altında kollajen olduğu düşünülen kollajen tabakası ve dışında düz kas hücrelerinden oluşan oldukça kalın bir orta tabaka gözlenmektedir. Verhoeff van Gieson, A) x2.5, B) x5.

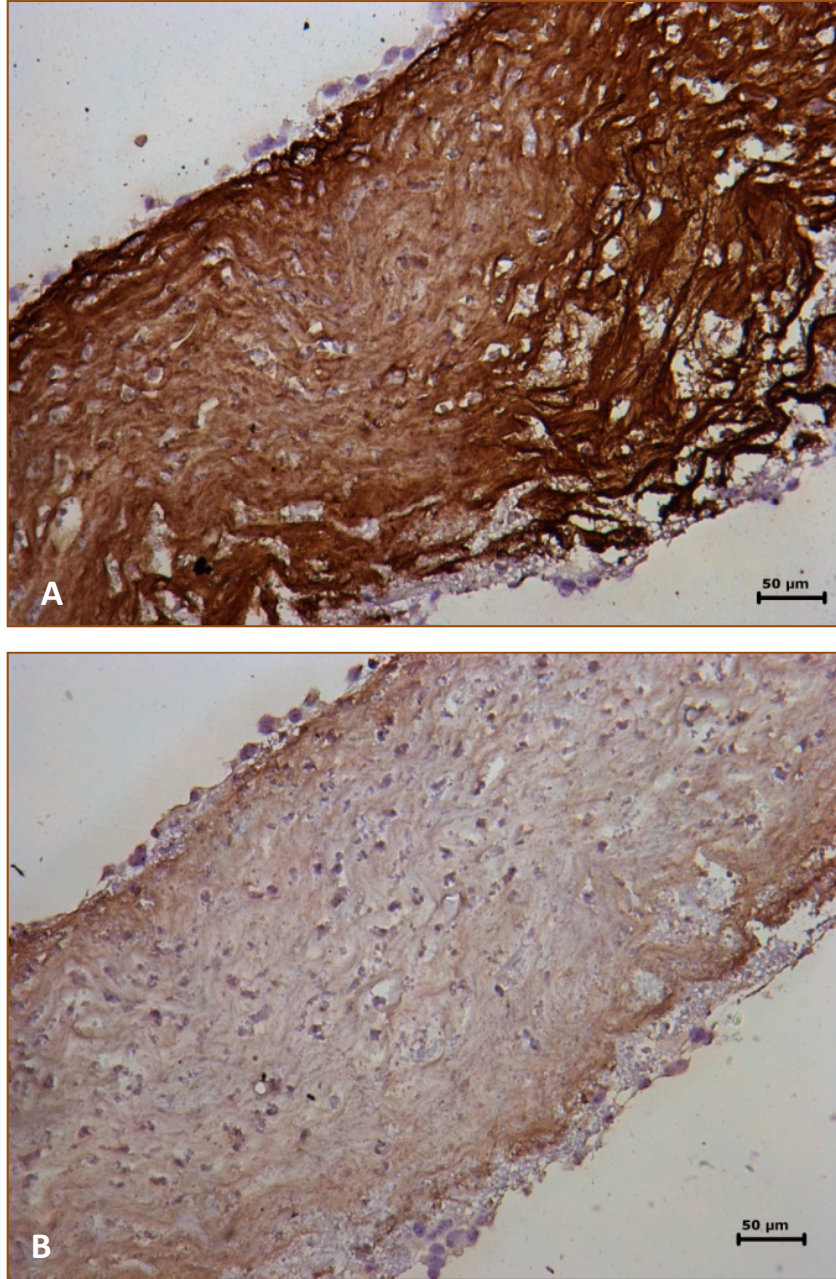
#### 4.5.4. Kollajen Tip I ve III Dağılımı

Normal bir damarın mekanik dayanıklılığını ve yapısal bütünlülüğünü SMC'lerin salgıladığı bir ekstraselüler matriks proteini olan kollajen sağlar. Kollajen, damara uzama/gerilme günü katar, böylece damar yapısı bozulmadan bir bütün halinde kalabilir. Damara uygulanan gerginlik ile büyüme faktörleri, askorbik asit (vitamin C) ve aminoasitlerin besi yerine eklenmesinin kollajen salgısını arttırdığı yönünde bilgiler literatürde mevcuttur (98). Kollajen fiberlerin çapraz bağlanması çok önemlidir. Böylece ekstraselüler matriksteki metalloproteinaz ve benzeri enzimlerin kendilerini parçalamalarına karşı daha dayanıklı olurlar. Bu çapraz bağlanmayı sağlayan enzimleri aktive eden etmenlerden biri bakır (Cu) elementidir. Bu bilgilerden yola çıkılarak bu çalışmada da kollajen salgısının arttırılıp çapraz bağlanmanın sağlanabilmesi için besi ortamına  $\text{CuSO}_4$  ve düzenli olarak askorbik asit eklenmiştir.

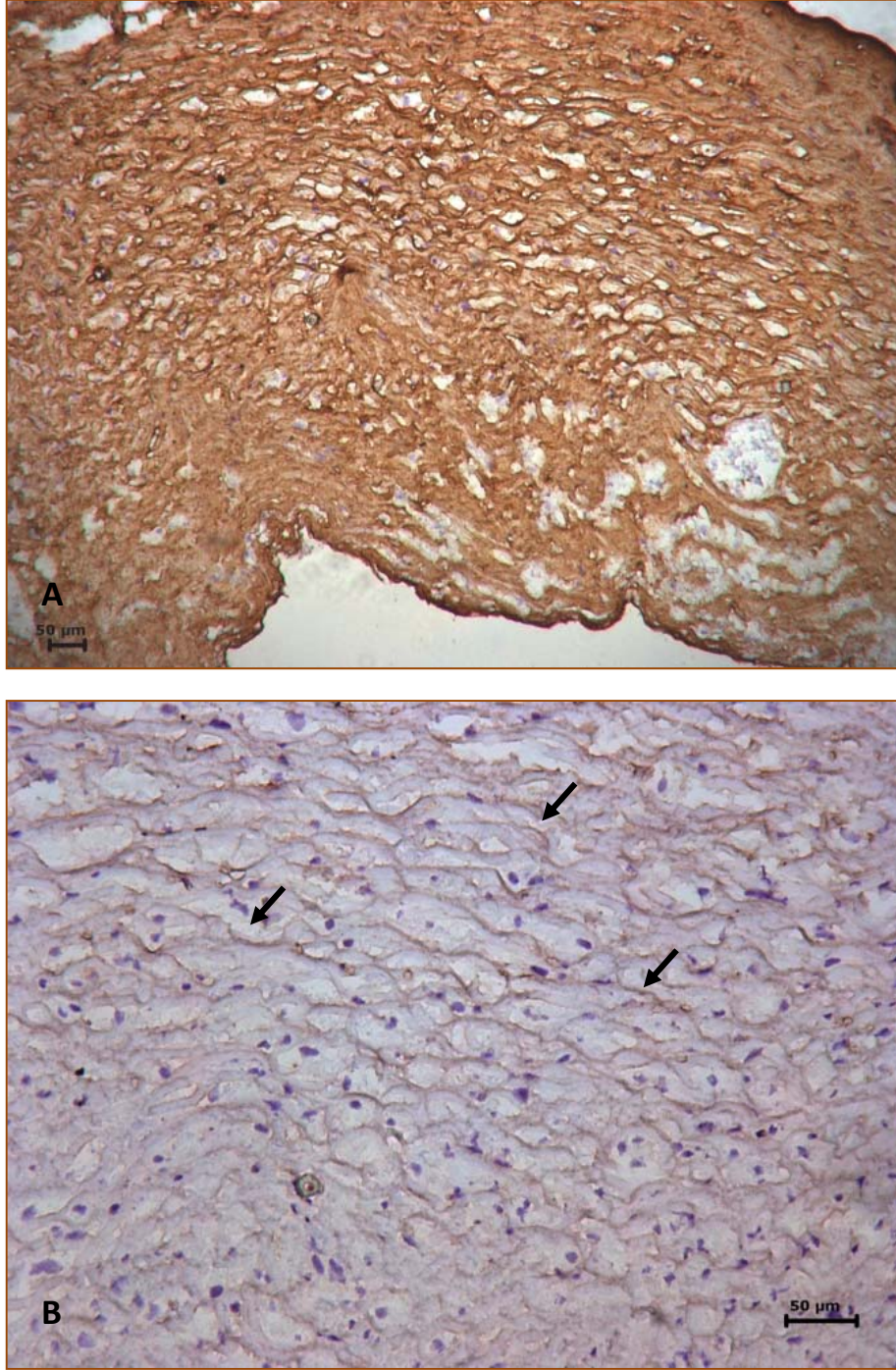
TEVG'lerde kollajenin varlığı ve toplam yüzdesi kadar önemli bir konu da ne çeşit kollajen dağılımının olduğudur. Canlı damarlarda orta tabakanın başlıca kollajen çeşitleri tip I ve tip III'tür (99). Bunların çeşidi ve oranı yaşa ve bulunduğu bölgeye göre değişkenlik göstermektedir. Kollajen tip I gevşek ve yoğun bağ dokularında bulunur. Vücut kollajeninin % 90 kadarını oluştursa da daha ziyade kemik, diş gibi daha sert dokularda bulunur çünkü kollajen tip I dokunun mekanik kuvvetlere ve gerinime karşı güçlü olmasını sağlar. Kollajen tip III esneme özelliği gösteren organların bağ dokularında bulunur. Bunlardan birisi de kan damarlarıdır. Tip III kollajen kan damarlarına yapısal destek ve elastiklik sağlar (9).

Kollajen tip IV ise epitelyum hücrelerin bazal laminalarını döşer. Böylelikle hem destek hem de filtrasyon görevinde bulunur. Bahsedilen diğer kollajen tiplerinden farklı olarak yapısı fibriller değildir (9). Kollajen tip IV boyamalarımızdan iyi sonuç elde edemememizin nedeni, endotel hücrelerinin henüz subendotel tabakayı oluşturacak zamana sahip olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Statik koşullar altında gerçekleştirilen kültürlerde herhangi bir akış ve atım uygulanmadığı için endotellerin sadece kollajen substratı aracılığıyla düz kaslarla bağlantı kurarak endotelyumu oluşturduğu fakat gerçek bir damarda olduğu gibi henüz lümen

boyunca uzamayarak gerekli proteinleri ve vazoaktif molekülleri salgılayacak duruma gelmediğini düşünmek mümkündür. Şekil 4.30 ve 4.31'da 8 ve 12 haftalık damar kesitlerinde indirekt immunoperoksidaz ile boyanmış kollajen tip I'in yaygın dağılımı izlenirken tip III kollajen fibrillerinin daha az sayıda ve çok ince olduğu görülmektedir.

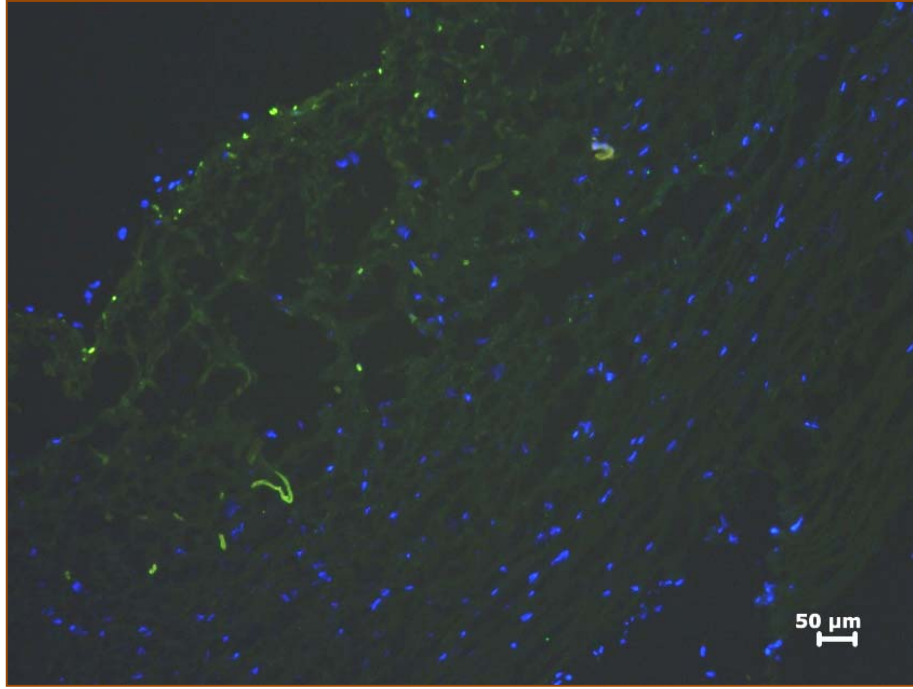


**Şekil 4.30.** 8 Haftalık damar kesitinde indirekt immunoperoksidaz ile boyanmış kollajen Tip I ve Tip III reaktivitesi. A) Koyu kahverengi ile boyanmış kollajen Tip I fibrillerinin orta tabakada baskın ve yaygın dağılımı, x20. B) Zayıf kollajen Tip III dağılımı. Hematoksilen, indirekt immunoperoksidaz, x20.

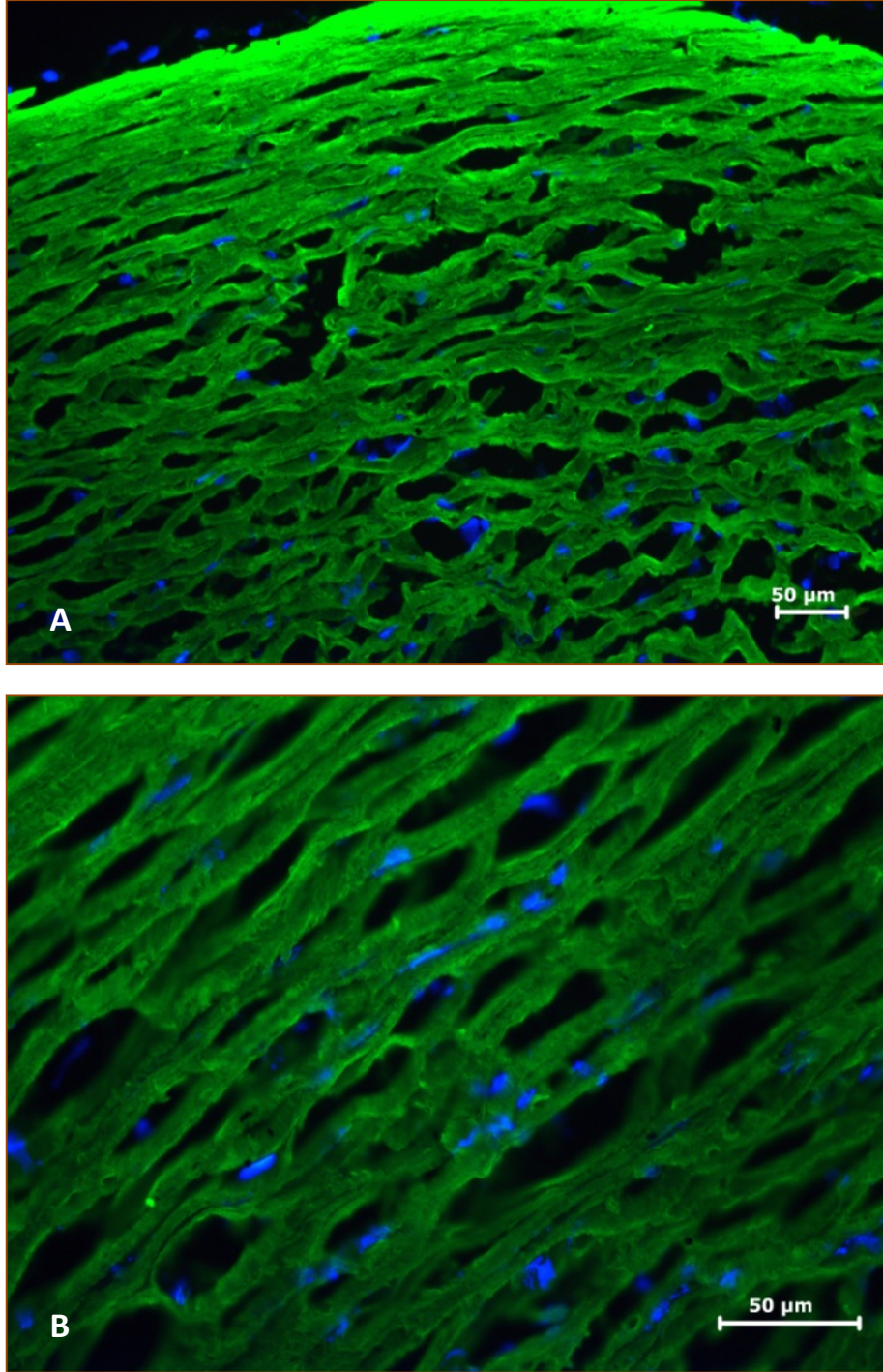


**Şekil 4.31.** 12 Haftalık damar kesitinde indirek immunoperoksidaz ile boyanmış kollajen tip I ve tip III reaktivitesi. A) Kollajen tip I fibrillerinin orta tabakada yaygın dağılımı gözlenmektedir, x10. B) Tip III fibrillerinin az sayıda ve çok ince (ok) olduğu izlenmektedir. Hematoksilen, indirekt immunoperoksidaz, x20.

12 Haftalık damar kesitlerinde FITC ile işaretli kollajen tip I, tip III, tip IV antikollarının dağılımları Şekil 4.32-33'de görülmektedir. Kollajen Tip I oldukça yaygın olarak orta tabaka bölgesinde izlenirken, kollajen tip III reaktivitesine az rastlanılmıştır. Endotel bazal laminasında bulunması beklenen kollajen tip IV için yapılan immunohistokimya analizinde ise immunreaktivitenin görülmemesi, henüz endotel hücrelerinden bazal lamina oluşturmak için gerekli salgıyı yapacak yeterli süreye sahip olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.



**Şekil 4.32.** 12 Haftalık damar kesitlerinde kollajen tip III floresan görüntüsü, FITC ile işaretli kollajen tip III dağılımı. DAPI çekirdek boyasıyla boyanmış çekirdekler de mavi renkte görülmektedir. DAPI, indirekt immunfloresan, x10.



**Şekil 4.33.** 12 Haftalık damar kesitlerinde kollajen tip I floresan görüntüsü. FITC ile işaretli kollajen tip I yeşil renkte, DAPI çekirdek boyasıyla boyanmış çekirdekler de mavi renkte izlenmektedir. DAPI, indirekt immunfloresan, A) x20, B) x40.

#### 4.5.5. Endotelyum

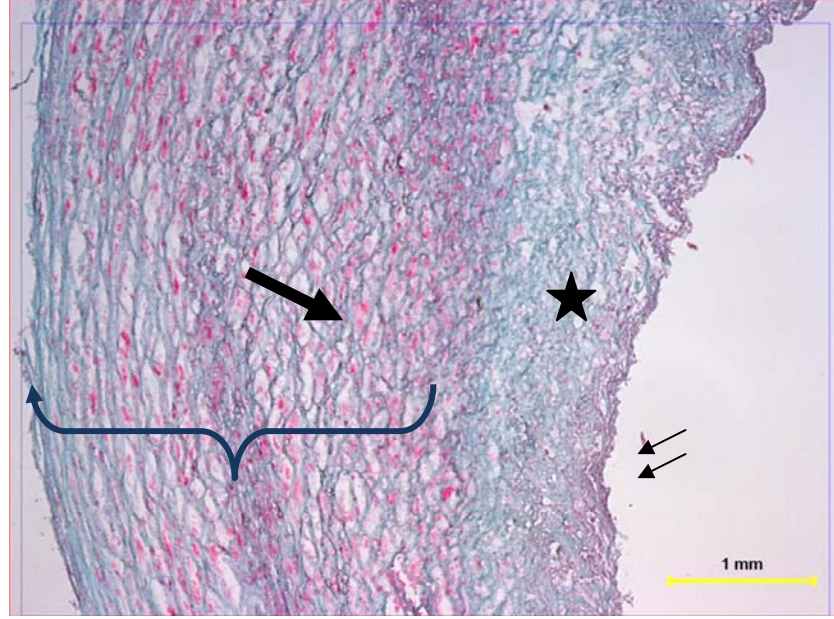
İdeal bir biyolojik greft, kesintisiz tek sıra endotel hücrelerden meydana gelen bir endotelyuma ve iyi farklılaşmış düz kas hücrelerine sahip olmalıdır. Endotelyumun damarın iç tabakasında tek sıra halinde olan devamlı kapiller dizilimi onun damardaki en işlevsel durumunu ifade eder. Endotelyumun kan akışı sırasında pıhtılaşmayan bir yüzey oluşturacak molekülleri salgılaması ve kan ile subendotel dokular arasında bir bariyer oluşturması bakımından elde edilecek greftlerde mutlaka düzgün bir yapıda olması gerekmektedir. Ancak tek sıra endotelyumu oluşturmanın in-vitro koşullarda zor olduğunu araştırmalar göstermiştir. Bu nedenle literatürde birçok ko-kültür modelleri oluşturulmuş ve EC'lerin, SMC'lerin oluşturduğu orta tabakaya tutunmasını sağlamak için birçok ekstraselüler matriks elemanı denenmiştir (bakınız bölüm 2.2.5). Benzer şekilde laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda ko-kültür modeli oluşturulmuş ve ekstraselüler matriks elemanı olarak kollajen, hyalüronik asit, fibronektin ve bunların karışımları, oluşturulan bu ko-kültür modellerinde kullanılmıştır. Ancak bu çalışmalar sonucunda genel olarak kullanılan tüm substratlarda EC'lerin tabakalanmış SMC'ler üzerinde kümeler halinde bulunduğu, beklenildiği gibi yayılmadığı tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar literatürde de mevcuttur (83). Bu nedenle endotelyumun oluşturulmasının 3-boyutlu bir yapıda yani media tabakası oluştuktan sonra biyoreaktör ortamının oluşturulmasının daha gerçekçi bir yaklaşım olduğu düşünülmüştür.

Bu amaçla statik koşullar altında olgunlaştırılan damar örneklerinden 8 hafta ve 12 haftalık damar örneklerinde endotelyum oluşturma çalışmaları yapılmıştır. Endotelyumun düz kas hücresi tabakasına tutunmasını kolaylaştıracak bir substrat olan kollajen çözeltisi kullanılmıştır. Endotelyumu oluşturmak için damar lümeni kollajen çözeltisi ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ile inkübe edilerek sonra EC'ler damar lümenine ekilmiş ve endotelyumu oluşturma süreci gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde inkübe edilen TEVG'lerde endotelyumun oluşumu, 12 saat, 7 gün, 10 gün süreler sonunda damar yapılarından kesitler alınarak immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

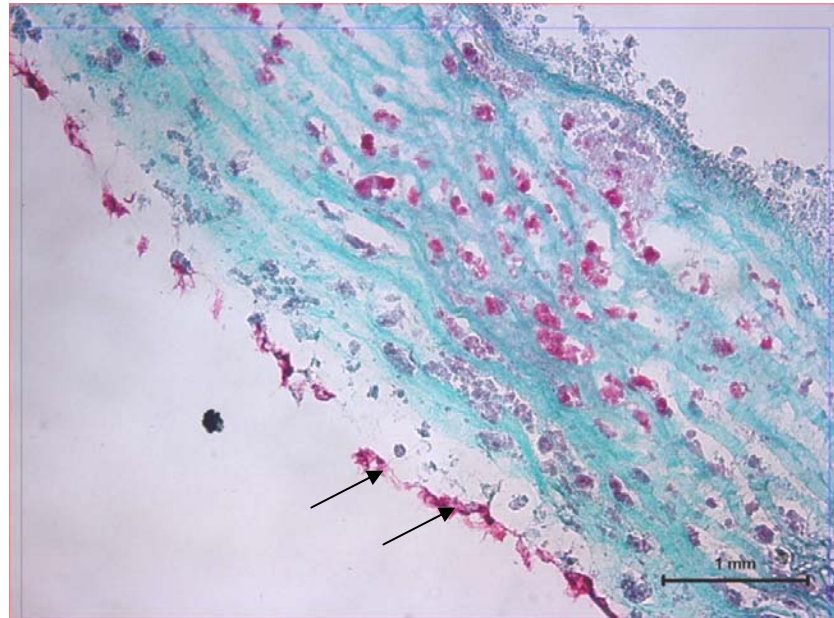
12 Haftalık TEVG'lerde damar lümenine ekilen endotel hücreleri ile yapılan deneyin kısa süre (12 saat) kültüre edilmesinin ardından alınan damar enine kesitinde lümen etrafına yerleşmiş EC dizisinin birbirleriyle ardarda dizilmiş oldukları, kollajenin substrat olarak kullanılmasına rağmen ancak bazı bölgelerde açıklıkların bulunduğu (Şekil 4.34) gözlenmiştir. Bu nedenle kullanılan hücre sayısı ile birlikte 12 saatin endotellerin damar lümeninde kollajen kullanılsa dahi tek sıra endotel tabakasının oluşumu için yeterli bir süre olmadığı tespit edilmiştir. Endotel hücrelerinin ayırt edilebilen en belirgin özellikleri lümene doğru çıkıntılılaşan çekirdekleridir. Endotel hücrelerinin altında oldukça geniş bir alanı dolduran trikrom boyası ile mavi-yeşil renkte boyanmış büyük büyütmelede kıvrımları ile ayırt edilebilen ve substrat olarak kullanılan kollajenin fibriller oluşturduğu sanılan oldukça kalın bir iç tabakanın oluşumu izlenmektedir. İç tabakanın hemen dışında birbirlerine bağlantı birimleriyle tutunmuş ve tabakaların kalınlaşması ile damar duvarının kalınlaştığını gösteren trikrom boyası ile kırmızı çekirdekleri ile orta tabakanın yapılıması dikkat çekicidir (Şekil 4.34).

Diğer taraftan endotel hücrelerinin 7 gün kültüre edildikten ve kollajenin ara protein olarak kullanılmadığı 8 haftalık TEVG'lerde yine EC'lerin tam olarak düz kas tabakası ile bağlantılarını kuramadığı ve yer yer kesintilerin olduğu izlenmiştir (Şekil 4.35). Bu nedenlerle bundan sonraki çalışmalarda kollajenin kullanılmasına ve inkübasyon süresinin 10 güne çıkarılmasına karar verilmiştir.

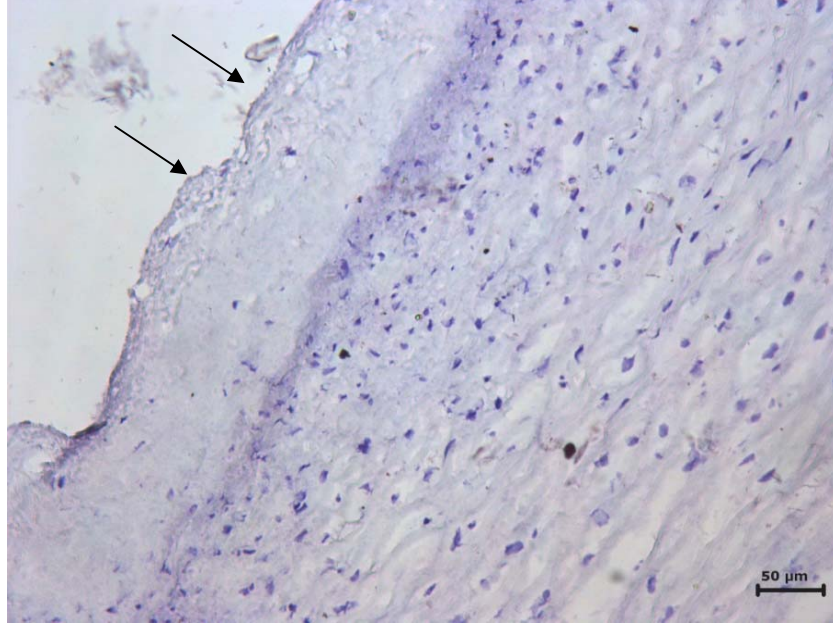
12 TEVG'lerde 10 inkübasyon süresi uygulanarak ve kollajenin ara madde olarak kullanıldığı damar yapısında endotel hücrelerin daha iyi proliferasyon olarak lümeni kesintisiz dölşeyecek şekilde bir dizilim gösterdikleri izlenmiştir (Şekil. 4.36-39). EC'lere özgül von Willebrand faktörün varlığı immunoperoksidaz boyama tekniği ile gösterilmiştir. Diğer taraftan damar lümeninde tunika intimaya benzer bir yapının oluştuğu izlenmektedir (Şekil 4.36). Bu tabakanın EC'lerin daha iyi tutunması için kullanılan kollajenden kaynaklandığı düşünölmekte olup kullanılan kollajen miktarının azatılması yönündeki çalışmalımız devam etmektedir.



**Şekil 4.34.** 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 12 saat sonraki görüntüleri. Damar kesitinde sağda lümen etrafına yerleşmiş muhtemelen endotel hücrelerinin lümene doğru çıkıntılılaşan çekirdeklerinin (çift ok) altında oldukça geniş alanı dolduran mavi-yeşil renkli kollajen fibriller (yıldız) ve oldukça kalın tabakalanma gösteren düz kas hücreleri ve kırmızı çekirdekleri (kalın ok) izlenmektedir. Masson's trikrom, x10.



**Şekil 4.35.** 8 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 7 gün sonraki görüntüleri. Damar kesitin daha büyük büyütmelerinde solda endotel hücre dizisi (çift ok) ve bağlantı birimleri oluşturarak birbirine tutunan düz kas hücreleri belirgin olarak izlenmektedir. Masson's Trikrom, x40.



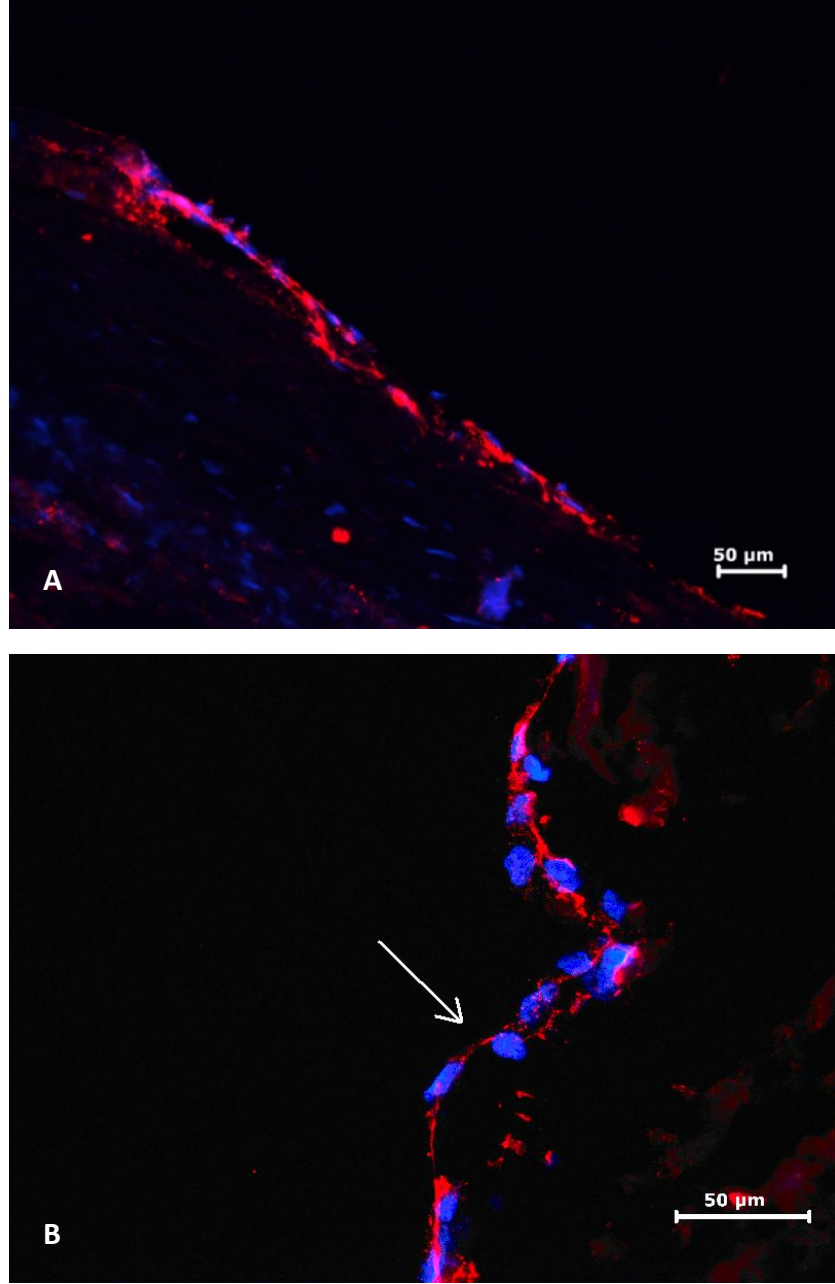
**Şekil 4.36.** 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonraki görüntüleri. İndirekt immunoperoksidaz ile boyanmış von Willebrand granüllerine ait immunreaktivite gösteren endotel hücreleri (ok) izlenmektedir. Hematoksilen, indirekt immunoperoksidaz, x20.

12 haftalık damar kesitlerin lümeninde EC'lerin sitoplazmasında yerleşmiş von Willebrand proteini TRITC ile işaretlenerek kırmızı renkte ve DAPI çekirdek boyasıyla boyanmış çekirdekler ise mavi renkte görülmektedir (Şekil 4.35). İkili boyama tekniği ile EC ve SMC'lerin floresan mikroskopunda görünüşleri birarada izlenmiştir. TRITC ile işaretlenmiş endotel hücreleri kırmızı ve FITC ile işaretlenmiş düz kas hücreleri yeşil renkte izlenmektedir. İki hücre çeşidinin çekirdekleri DAPI boyamasıyla mavi olarak görülmektedir (Şekil 4.38-39). Tüm bu boyama tekniklerinde EC'lerin lümen etrafında kesintisiz tek sıra halinde yer aldığı ve tabanında kollajen fibrillerin olduğu açıkça görülmektedir.

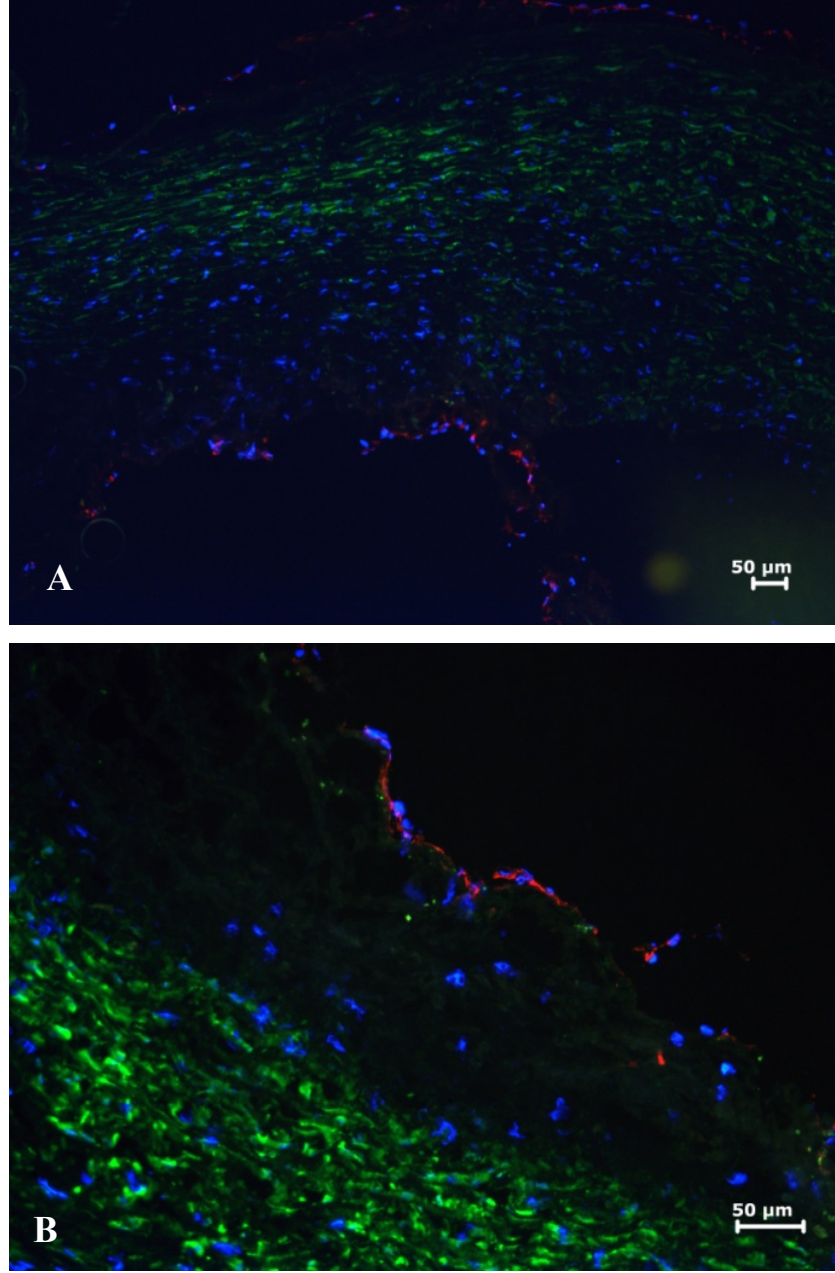
Daha önce belirtildiği gibi ideal bir biyolojik greft, kesintisiz tek sıra endotel hücrelerden meydana gelen işlevsel bir endotelyuma sahip olmalıdır. Çalışmalar tek sıra endotelyumu oluşturmak üzerine yoğunlaşmış olmasına rağmen ko-kültür denemeleri in-vivo koşulları taklit etmediği için çok başarılı çalışmalar elde edilememiştir. Yapılan bir çalışmaya göre, dinamik koşullara sahip bir biyoreaktör

sistemi içerisinde PGA meşler üzerinde 3 boyutlu bir greft modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada SMC'ler ekilip 10 gün ve 23 gün boyunca kültüre edilmiştir. EC'ler ilk grefte 10. günden itibaren ekilmiş ve 15 gün boyunca kokültürü yapılmış, ikinci grefte 23. günden itibaren ekilmiş ve 2 gün boyunca kokültürü yapılmıştır (61). Bu iki deney grubunda da SEM görüntüleri aracılığıyla tek sıralı endotelyum tabakası gözlenmiş, 15 gün boyunca kokültürü yapılan EC'lerin pulsatif akım sayesinde daha uzamış bir morfolojide olduğu tespit edilmiştir (61). Bu çalışmada ise özetle EC'lerin damar lümenindeki 12 saatlik inkübasyonu sonucunda yer yer tutundukları, ancak kesintisiz olarak tutunabilmeleri için en az 10 günlük bir inkübasyon süresinin gerekli olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan görüleceği gibi TEGV'lerin inşasında hücre kaynaklarının, kültür şartlarının, destek materyallerinin ve mekanik şartların farklı olmasından kaynaklanan pek çok parametre rol oynamaktadır.

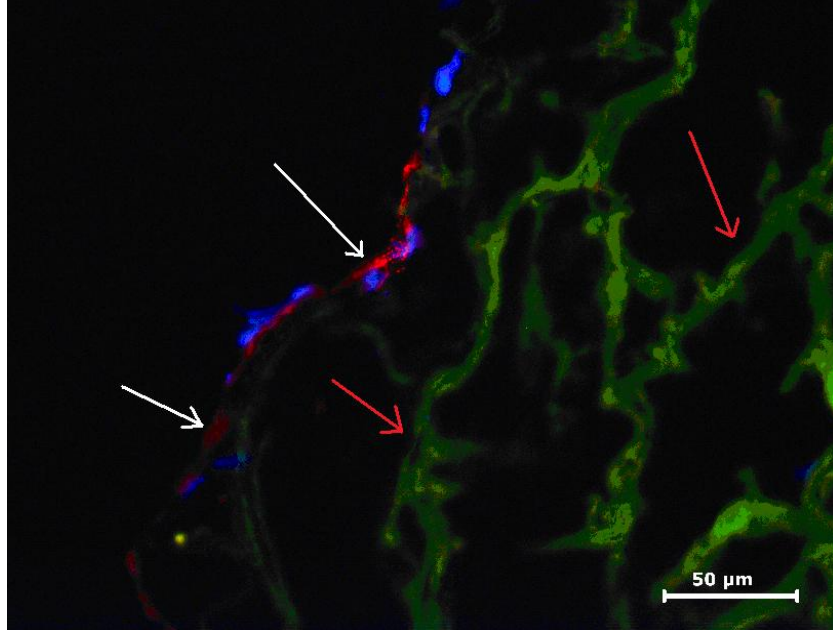
Sonuç olarak 10 günlük inkübasyon sonrası endotellerin kollajen substratı aracılığıyla düz kaslarla bağlantı kurarak endotelyumu oluşturduğu, böylece iki katmanlı bir yapının inşası ile gerçek damar yapısına yaklaşımın sağlandığı söylenebilir. Çalışmalarımız kollajenin yanında laminin ve fibronektin gibi farklı ekstraselüler matriks elemanlarının kullanılarak ara yüzeydeki miktarları, bu proteinlerin varlığında SMC-EC ilişkileri ve endotelyumun işlevselliğinin araştırılması yönünde devam etmektedir.



**Şekil 4.37.** 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonraki görüntüleri. Endotel hücrelerinin sitoplazmasında yerleşmiş vonWillebrand proteini TRITC ile işaretlenerek kırmızı renkte (beyaz ok), DAPI çekirdek boyasıyla boyanmış çekirdekler ise mavi renkte izlenmektedir. DAPI, indirekt immunofloresan, A) x20, B) x40.



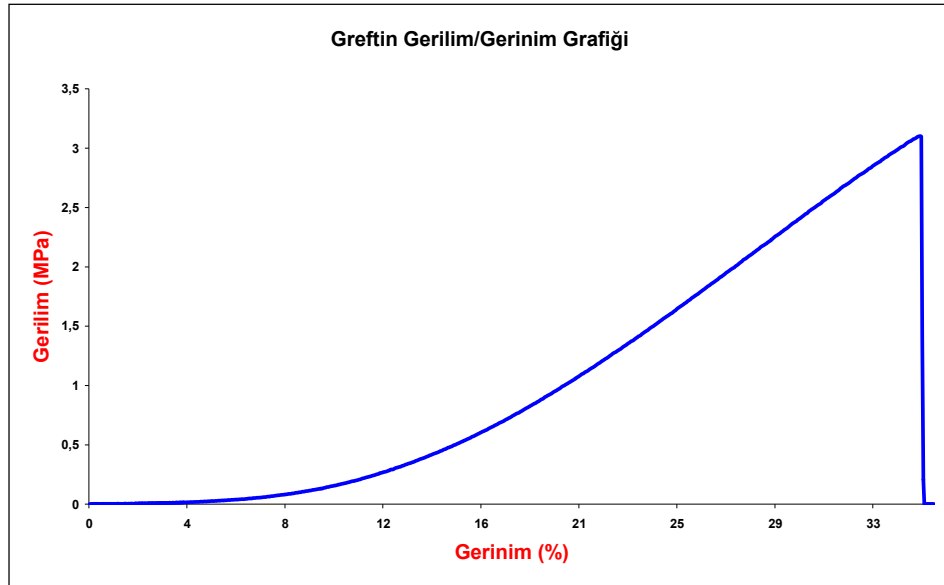
**Şekil 4.38.** 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonraki ikili boyama görüntüleri. TRITC ile işaretlenmiş endotel hücreleri kırmızı ve FITC ile işaretlenmiş düz kas hücreleri yeşil renkte görülmektedir. Her iki hücre grubunun arasında herhangi bir floresan işaretlenme göstermeyen alan muhtemelen kollajen tabakasının oluşturduğu bölgedir. DAPI çekirdek boyasıyla boyanmış çekirdekler mavi renkte izlenmektedir. DAPI, FITC-TRITC, A) x10, B) x20.



**Şekil 4.39.** 12 Haftalık damar lümenine ekilen EC'lerin 10 gün sonra gerçekleştirilen ikili boyama görüntüsü damar duvarının lümenine yakın tarafından alınan daha büyük büyütmede izlenmektedir. Beyaz okla gösterilmiş von willebrand içeren ve tek sıra halinde dizilmiş endotel hücreleri ve kırmızı okla gösterilmiş kollajen tip I yapısı görülmektedir. DAPI, x40.

#### 4.5.6. Damar Greftlerin Mekanik Özellikleri

TEVG'lerin mekanik özellikleri birçok yöntemle (patlama basıncı, damar gerilimi, suture dayanımı gibi) ölçülmektedir. Ancak bütün bu testler için çok fazla damar örneğine ihtiyaç vardır. Bir damarın oluşum süresi ortalama 3 ay gerektirdiği için çalışmamızda sadece çekme mukavemeti incelenmiştir. Mekanik test cihazı ile 12 haftalık inkübasyon süresi sonunda biyoreaktörden alınan TEVG'in uzunlamasına (longitudinal) yönde yapılan çekme testinde greftin çekme mukavemeti 3.1 MPa olarak ölçülmüştür. Greft kopmadan hemen öncesine kadar % 35 gerinim göstermiştir. Gerilim-gerinim grafiği; hemen başlangıçta lineer seyir izlememiş olup ancak % 20 gerinim değerinden sonra lineer bir seyir izlemiştir. Bu nedenle greftin elastik modülüsünü hesaplamak için gerilim-gerinim grafiğinin lineer bölgesinin hemen başlangıcındaki eğim değeri kullanılmış olup elastik modülüs olarak yaklaşık 0.13 bulunmuştur.



**Şekil 4.40.** TEVG'lerin gerilim-gerinim grafiği.

Literatüre bakıldığında öne çıkan sistemler içerisinde güçlendirilmiş kollajen bazlı damar greftlerin mekanik özellikleri (maksimum damar gerilimi 40–250 KPa, kopma direnci 500 mmHg'dan düşüktür) arter implantasyonu için gerekli mekanik dayanımın altında kalmıştır (74). Canlı arterlerde maksimum damar gerilimi 6.0 MPa ve patlama direnci ise 2000 mmHg'dan büyüktür. Canlı arterlerin mekanik özelliklerine Niklason ve çalışma arkadaşları tarafından üretilen PGA bazlı mühendislik damarlarının sahip olduğu gözlenmiştir (46).

Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen damarlarlarda elde edilen maksimum gerilim (3.1 MPa) canlı arterlerin gerilimine yaklaşmıştır. Daha önce bahsedildiği gibi damarının mekanik gücünü etkileyen faktörler kollajen ve elastinin olmakla birlikte media tabakasındaki SMC'lerin kasılma yetenekleri de önemli ölçüde rol oynamaktadır. Dinamik şartların (pulsatif stres) SMC'lerin fenotipini etkilediği ve SMC'lerin kasılma yeteneklerini, dolayısı ile mekanik özelliklerini artırdığı yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (46). Ancak çalışmamızda oluşturulan damar sistemleri statik şartlarda gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle statik koşullarda elde edilen damar geriliminin canlı arterlerin değerine yaklaşmasının oldukça iyi organize olmuş kollajen fiberlerin (tip I) ve elastinin varlığına bağlamaktayız.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Fonksiyonel doku ve organların *in vitro*'da üretilmesini amaçlayan doku mühendisliği son yıllarda hızlı bir gelişme göstermiştir. Doku mühendisliği yöntemiyle üretilen deri ve kıkırdak, günümüzde büyük bir pazar payına sahiptirler (100). Hayvan testleri süren dokular arasında bağırsak (101-102), idrar kesesi (103), omurilik (104) ve ses telleri (105) örnek olarak verilebilir. Üretilmiş dokuların birçoğu, örneğin; kıkırdak, kemik, kornea ve damar insanlarda denenmektedir. Ancak yapılan araştırmalar damar ve kalp kapakçıkları gibi daha karmaşık yapıları laboratuvar ortamında üretmenin daha zor olduğu ve sanıldığından daha uzun süreceğinin sinyallerini vermekte olup araştırmalar bu yönde devam etmektedir.

Bu tez kapsamında vasküler doku mühendisliği yaklaşımı ile statik koşullarda otolog hücrelerden *in vitro* koşullarda biyolojik vasküler greftlerin tasarlanması ve inşa edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla genç sığır damarlarından izole edilen düz kas ve endotel hücreler modifiye edilmiş PGA meşlerin üzerine ekilerek *in vitro* koşullarda biyolojik vasküler greftler inşa edilmiştir. TEVG'lerin zamana karşı gelişimi incelenmiş ve 12 hafta inkübasyon sonunda dış çapı 3.8 mm olan ve duvar kalınlığı 0.9 mm olan biyolojik vasküler greft elde edilmiştir. Elde edilen damarın morfolojisi tipik bir canlı arter görüntüsünde olup maksimum gerilme direnci 3.1 MPa, kopmada % gerinimi ise 35 olarak bulunmuştur. İmmunohistokimyasal değerlendirmeler ise bu greftlerin kan damarları yapısını gösterdiğini doğrulamıştır. Diğer önemli bir çıktı ise; damar yapılarında çok az miktarda da olsa elastin varlığının yapılan immunohistokimyasal değerlendirmeler ile ispatlanmış olmasıdır. Literatürde belirtildiği gibi çoğu TEVG'lerde elastin bulunmamaktadır ve bu greftlerdeki elastin sentezi üzerinde yeterli çalışmalar yapılmamıştır. Elastin, vasküler SMC'lerin aktivitesinde potansiyel otokrinler olarak görev alır ve fibroblast patolojide önemlidir. (95). Bunun yanında elastinin yokluğunun tıpkı aterosklerozda olduğu gibi subendotelial hasar oluşması ve SMC'lerin düzgün organize olmaması gibi durumlara neden olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır

(97). Bu sebeplerle arterlerde elastinin bulunması damarın hem yapısal hem de fizyolojik özellikleri bakımından büyük önem taşımaktadır.

TEVG'lerde karşılaşılan bir diğer önemli sorun damar lümeninde tek sıralı bir endotelyum oluşturmaktır (98). Bu sorunun üstesinden gelebilmek için yapılan çeşitli çalışmalarda başarı sağlansa da istenilen sonuçlar elde edilememiştir (60-61). Bu çalışmamızda EC'lerin SMC'lere tutunmasını sağlamak amacıyla EC'ler lümene ekilmeden önce lümeden kollajen A geçirilmiş ve 12 haftalık greftte tek sıralı dizilmiş endotel hücre görüntüsüne rastlanmıştır. Ancak hem teknik olarak hem de moleküler düzeyde araştırılması gereken birçok konu vardır. Örneğin; makroskopik ve immunohistokimyasal sonuçlara göre en iyi verilerin elde edildiği damar kültür süresi 12 haftalık damar greftidir. Bu süre klinik uygulamalar açısından oldukça uzun bir süredir. Fakat burda göz önünde bulundurulması gereken bir konu, bu çalışmanın statik koşullar altında yürütülmüş olduğudur. Dinamik koşullar altında çalışılan sistemlerde damar oluşma süresinin kısaldığı ve özellikle atım verilen modellerde hücrelerin düzenlenmesi ile salgılanan ekstraselüler matrik düzeylerinin gerçek bir damara daha yakın bir profil çizdiği bilinmektedir (106). Bu nedenle statik koşullar altında salgılanan elastin miktarının sınırlı ve kültür süresinin daha uzun sürmesi beklenen sonuçlar arasındadır. Bu durum, çalışmalarımızı kliniğe taşıyabilmek için dinamik koşullara olan gereksinimi yani dolaşım sisteminin *in vitro*'da *in vivo*'da olduğu gibi taklit edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak bundan sonraki çalışmalarımızın dinamik koşullar altında sürdürülmesine karar verilmiştir. Literatürde dinamik koşullarda 8 hafta gibi başarılı örnekler elde edilmiş olsa da, damarları elde etme süresini azaltmak ve besiyeri gibi hücrelerin fizyolojik ve vazoaaktif cevaplarını etkileyecek ortamlarda yapılacak değişiklikler, gerçeğine daha uygun damarların elde edilmesinde yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kalp damar hastalıklarına sıkça rastlanmaktadır. Bu ihtiyacı karşılamak için tüm dünyadaki çalışmalara paralel olarak vasküler doku mühendisliği yaklaşımıyla damar greftlerinin üretilmesine yönelik tekniğin ülkemizde de geliştirilmesi önemli bir adımdır. Bu çalışma sonunda ortaya çıkan damar prototipi, teknoloji ve insan sağlığı

açısından değerli olmakla birlikte elde edilen çıktılar hücre transplantasyonu açısından da büyük önem taşımaktadır. Diğer taraftan vasküler hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılacak yonga gibi mikro/nano-teknolojik yaklaşımlar için de bir alt yapı oluşturmuştur. Bununla birlikte bu çalışmanın sonuçları vasküler doku mühendisliği alandaki bilgilerimize oldukça önemli katkı sağladığı gibi, insan atar damarlarının *in vitro* mühendisliği alanında gerçekleştirilmesi planlanan ileri çalışmalar için de kuvvetli bir temel oluşturmuştur.

## KAYNAKLAR

1. Parikh, S.A., Edelman, E.R. (2000) Endothelial cell delivery for cardiovascular therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 42 (1-2), 139-161.
2. Nerem, R.M., Seliktar, D. (2001) Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 3, 225-243.
3. Wang, X., Lin, P., Yao, Q., Chen, C. (2007) Development of small-diameter vascular grafts. *World J Surg*, 31 (4), 682-689.
4. Klinkert, P., Post, P.N., Breslau, P.J., van Bockel, J.H. (2004) Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 27 (4), 357-362.
5. Tiwari, A., Cheng, K.S., Salacinski, H., Hamilton, G., Seifalian, A.M. (2003) Improving the patency of vascular bypass grafts: the role of suture materials and surgical techniques on reducing anastomotic compliance mismatch. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 25 (4), 287-295.
6. Kakisis, J.D., Liapis, C.D., Breuer, C., Sumpio, B.E. (2005) Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg*, 41 (2), 349-354.
7. Teebken, O.E., Haverich, A. (2002) Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23 (6), 475-485.
8. Martini, F.H. (2006). *Fundamentals of Anatomy and Physiology (7th bs.): Pearson/Benjamin Cummings.*
9. Ross, M.H., Kaye, G. I., Pawlina, W. (2003). *Histology, A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology (4th bs.). Philadelphia.*
10. Aktümsek, A. (2004). *Anatomi ve Fizioloji, İnsan Biyolojisi. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.*
11. Lytle, B.W. (2004) Prolonging patency--choosing coronary bypass grafts. *N Engl J Med*, 351 (22), 2262-2264.
12. Edelman, E.R. (1999) Vascular tissue engineering : designer arteries. *Circ Res*, 85 (12), 1115-1117.
13. Kanda, K., Matsuda, T. (1994) In vitro reconstruction of hybrid arterial media with molecular and cellular orientations. *Cell Transplant*, 3 (6), 537-545.
14. Tiwari, A., Salacinski, H., Seifalian, A.M., Hamilton, G. (2002) New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg*, 10 (3), 191-197.
15. van Lith, R. (2004). *Small-diameter vascular tissue engineering. Master Thesis, Eindhoven University of Technology Faculty of Biomedical Engineering., Eindhoven.*

16. Mazzucotelli, J.P., Moczar, M., Zede, L., Bambang, L.S., Loisanca, D. (1994) Human vascular endothelial cells on expanded PTFE precoated with an engineered protein adhesion factor. *Int J Artif Organs*, 17 (2), 112-117.
17. Kidane, A.G., Salacinski, H., Tiwari, A., Bruckdorfer, K.R., Seifalian, A.M. (2004) Anticoagulant and antiplatelet agents: their clinical and device application(s) together with usages to engineer surfaces. *Biomacromolecules*, 5 (3), 798-813.
18. Begovac, P.C., Thomson, R.C., Fisher, J.L., Hughson, A., Gallhagen, A. (2003) Improvements in GORE-TEX vascular graft performance by Carmeda BioActive surface heparin immobilization. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 25 (5), 432-437.
19. Sipehia, R., Martucci, G., Lipscombe, J. (1996) Transplantation of human endothelial cell monolayer on artificial vascular prosthesis: the effect of growth-support surface chemistry, cell seeding density, ECM protein coating, and growth factors. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 24 (1), 51-63.
20. Rashid, S.T., Salacinski, H.J., Fuller, B.J., Hamilton, G., Seifalian, A.M. (2004) Engineering of bypass conduits to improve patency. *Cell Prolif*, 37 (5), 351-366.
21. Campbell, G.R., Campbell, J.H. (2007) Development of tissue engineered vascular grafts. *Curr Pharm Biotechnol*, 8 (1), 43-50.
22. Demiralp, T., Kayserilioğlu, A., Yiğit, R., Direskeneli, G., S., Aydın, Z. (2001). Kardiyopulmoner ve Kan Fizyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri.
23. Emre, M. (2005). Endotel ve Sistemlerimiz: Sanovel.
24. Alberts B., J.A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*.
25. Bennett, H.S., Luft, J.H., Hampton, J.C. (1959) Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol*, 196 (2), 381-390.
26. Bachetti, T., Morbidelli, L. (2000) Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res*, 42 (1), 9-19.
27. Levick, J.R. (2000). *An Introduction to Cardiovascular Physiology* (3rd bs.). London: Arnold, Oxford University Press.
28. Luscher, T.F., Barton, M. (1997) Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, 20 (11 Suppl 2), II-3-10.
29. Yanagisawa, M., Masaki, T. (1989) Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol*, 38 (12), 1877-1883.
30. Schnitzer, J.E. (1998) Vascular targeting as a strategy for cancer therapy. *N Engl J Med*, 339 (7), 472-474.

31. Bachetti, T., Ferrari, R., Visioli, O. (1998) [Endothelium in the control of vascular tone: the physiological role]. *Cardiologia*, 43 (8), 793-804.
32. Davignon, J., Ganz, P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109 (23 Suppl 1), III27-32.
33. SoRelle, R. (1998) Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation*, 98 (22), 2365-2366.
34. Kiowski, W., Luscher, T.F., Linder, L., Buhler, F.R. (1991) Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation*, 83 (2), 469-475.
35. Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362 (6423), 801-809.
36. Whitelock, J., Mitchell, S., Graham, L., Underwood, P.A. (1997) The effect of human endothelial cell-derived proteoglycans on human smooth muscle cell growth. *Cell Biol Int*, 21 (3), 181-189.
37. Campbell, J.H., Efendy, J.L., Campbell, G.R. (1999) Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res*, 85 (12), 1173-1178.
38. Weinberg, C.B., Bell, E. (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 231 (4736), 397-400.
39. L'Heureux, N., Germain, L., Labbe, R., Auger, F.A. (1993) In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg*, 17 (3), 499-509.
40. Girton, T.S., Oegema, T.R., Tranquillo, R.T. (1999) Exploiting glycation to stiffen and strengthen tissue equivalents for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, 46 (1), 87-92.
41. Girton, T.S., Oegema, T.R., Grassl, E.D., Isenberg, B.C., Tranquillo, R.T. (2000) Mechanisms of stiffening and strengthening in media-equivalents fabricated using glycation. *J Biomech Eng*, 122 (3), 216-223.
42. Seliktar, D., Black, R.A., Vito, R.P., Nerem, R.M. (2000) Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng*, 28 (4), 351-362.
43. Berglund, J.D., Mohseni, M.M., Nerem, R.M., Sambanis, A. (2003) A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials*, 24 (7), 1241-1254.
44. Koike, N., Fukumura, D., Gralla, O., Au, P., Schechner, J.S., Jain, R.K. (2004) Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature*, 428 (6979), 138-139.
45. L'Heureux, N., Paquet, S., Labbe, R., Germain, L., Auger, F.A. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*, 12 (1), 47-56.

46. Niklason, L.E., Gao, J., Abbott, W.M., Hirschi, K.K., Houser, S., Marini, R. ve diğerleri. (1999) Functional arteries grown in vitro. *Science*, 284 (5413), 489-493.
47. Shum-Tim, D., Stock, U., Hrkach, J., Shinoka, T., Lien, J., Moses, M.A. ve diğerleri. (1999) Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg*, 68 (6), 2298-2304; discussion 2305.
48. Watanabe, M., Shin'oka, T., Tohyama, S., Hibino, N., Konuma, T., Matsumura, G. ve diğerleri. (2001) Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Eng*, 7 (4), 429-439.
49. Hoerstrup, S.P., Zund, G., Sodian, R., Schnell, A.M., Grunenfelder, J., Turina, M.I. (2001) Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 20 (1), 164-169.
50. Hoerstrup, S.P., Kadner, A., Breyman, C., Maurus, C.F., Guenter, C.I., Sodian, R. ve diğerleri. (2002) Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg*, 74 (1), 46-52; discussion 52.
51. Badylak, S.F., Lantz, G.C., Coffey, A., Geddes, L.A. (1989) Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*, 47 (1), 74-80.
52. Roeder, R., Wolfe, J., Lianakis, N., Hinson, T., Geddes, L.A., Obermiller, J. (1999) Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res*, 47 (1), 65-70.
53. Huynh, T., Abraham, G., Murray, J., Brockbank, K., Hagen, P.O., Sullivan, S. (1999) Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat Biotechnol*, 17 (11), 1083-1086.
54. Inoue, Y., Anthony, J.P., Leon, P., Young, D.M. (1996) Acellular human dermal matrix as a small vessel substitute. *J Reconstr Microsurg*, 12 (5), 307-311.
55. Wilson, G.J., Courtman, D.W., Klement, P., Lee, J.M., Yeger, H. (1995) Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg*, 60 (2 Suppl), S353-358.
56. Rainger, G.E., Stone, P., Morland, C.M., Nash, G.B. (2001) A novel system for investigating the ability of smooth muscle cells and fibroblasts to regulate adhesion of flowing leukocytes to endothelial cells. *J Immunol Methods*, 255 (1-2), 73-82.
57. Ziegler, T., Alexander, R.W., Nerem, R.M. (1995) An endothelial cell-smooth muscle cell co-culture model for use in the investigation of flow effects on vascular biology. *Ann Biomed Eng*, 23 (3), 216-225.

58. Imberti, B., Seliktar, D., Nerem, R.M., Remuzzi, A. (2002) The response of endothelial cells to fluid shear stress using a co-culture model of the arterial wall. *Endothelium*, 9 (1), 11-23.
59. Korff, T., Kimmina, S., Martiny-Baron, G., Augustin, H.G. (2001) Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J*, 15 (2), 447-457.
60. Lavender, M.D., Pang, Z., Wallace, C.S., Niklason, L.E., Truskey, G.A. (2005) A system for the direct co-culture of endothelium on smooth muscle cells. *Biomaterials*, 26 (22), 4642-4653.
61. Williams, C., Wick, T.M. (2005) Endothelial cell-smooth muscle cell co-culture in a perfusion bioreactor system. *Ann Biomed Eng*, 33 (7), 920-928.
62. Wallace, C.S., Champion, J.C., Truskey, G.A. (2007) Adhesion and function of human endothelial cells co-cultured on smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng*, 35 (3), 375-386.
63. Di Luozzo, G., Bhargava, J., Powell, R.J. (2000) Vascular smooth muscle cell effect on endothelial cell endothelin-1 production. *J Vasc Surg*, 31 (4), 781-789.
64. Fillinger, M.F., Sampson, L.N., Cronenwett, J.L., Powell, R.J., Wagner, R.J. (1997) Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. *J Surg Res*, 67 (2), 169-178.
65. Alexander, J.J., Miguel, R., Graham, D., Piotrowski, J.J. (1992) The effect of thrombin on low-density lipoprotein permeability and uptake by an arterial endothelial smooth muscle cell bilayer. *J Vasc Surg*, 15 (4), 718-724; discussion 724-715.
66. Niwa, K., Sakai, J., Watanabe, T., Ohyama, T., Karino, T. (2007) Improved arterial wall model by coculturing vascular endothelial and smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 43 (1), 17-20.
67. Chung, J.H., Youn, S.H., Kwon, O.S., Cho, K.H., Youn, J.I., Eun, H.C. (1997) Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-beta and interferon-gamma in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent. *J Dermatol Sci*, 15 (3), 188-200.
68. Wang, Y.H., Yan, Z.Q., Shen, B.R., Zhang, L., Zhang, P., Jiang, Z.L. (2009) Vascular smooth muscle cells promote endothelial cell adhesion via microtubule dynamics and activation of paxillin and the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in a co-culture system. *Eur J Cell Biol*, 88 (11), 701-709.
69. Shinoka, T., Breuer, C. (2008) Tissue-engineered blood vessels in pediatric cardiac surgery. *Yale J Biol Med*, 81 (4), 161-166.
70. Samanek, M. (1992) Children with congenital heart disease: probability of natural survival. *Pediatr Cardiol*, 13 (3), 152-158.

71. Giannico, S., Hammad, F., Amodeo, A., Michielon, G., Drago, F., Turchetta, A. ve diğeri. (2006) Clinical outcome of 193 extracardiac Fontan patients: the first 15 years. *J Am Coll Cardiol*, 47 (10), 2065-2073.
72. Petrossian, E., Reddy, V.M., Collins, K.K., Culbertson, C.B., MacDonald, M.J., Lamberti, J.J. ve diğeri. (2006) The extracardiac conduit Fontan operation using minimal approach extracorporeal circulation: early and midterm outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 132 (5), 1054-1063.
73. Bermudez, C.A., Dearani, J.A., Puga, F.J., Schaff, H.V., Warnes, C.A., O'Leary, P.W. ve diğeri. (2004) Late results of the peel operation for replacement of failing extracardiac conduits. *Ann Thorac Surg*, 77 (3), 881-887; discussion 888.
74. L'Heureux, N., Dusserre, N., Marini, A., Garrido, S., de la Fuente, L., McAllister, T. (2007) Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts--from research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 4 (7), 389-395.
75. Shin'oka, T., Imai, Y., Ikada, Y. (2001) Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med*, 344 (7), 532-533.
76. Shin'oka, T., Matsumura, G., Hibino, N., Naito, Y., Watanabe, M., Konuma, T. ve diğeri. (2005) Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 129 (6), 1330-1338.
77. Naito, Y., Imai, Y., Shin'oka, T., Kashiwagi, J., Aoki, M., Watanabe, M. ve diğeri. (2003) Successful clinical application of tissue-engineered graft for extracardiac Fontan operation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 125 (2), 419-420.
78. L'Heureux, N., McAllister, T.N., de la Fuente, L.M. (2007) Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med*, 357 (14), 1451-1453.
79. Matsumura, G., Hibino, N., Ikada, Y., Kurosawa, H., Shin'oka, T. (2003) Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials*, 24 (13), 2303-2308.
80. Manchio, J.V., Gu, J., Romar, L., Brown, J., Gammie, J., Pierson, R.N., 3rd ve diğeri. (2005) Disruption of graft endothelium correlates with early failure after off-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg*, 79 (6), 1991-1998.
81. Freshney, R.I. (2005). *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique* (5th bs.): Wiley-Liss.
82. Klinger, R., Y. ve Niklason, L. E. (2006). *Tissue-Engineered Blood Vessels*. G. Vunjak-Novakovic, Freshney, R., I. (Ed.). *Culture of Cells for Tissue Engineering*: Wiley-Liss
83. Özen, M.Ö. (2009). *Doku Mühendisliği Tekniği ile Yapay Damar Dokusu Üretimi*. Ege Üniversitesi, İzmir.

84. Stegemann, J., P., Shaneen L., R., Nerem, R., M. (2006). Scaffolding in Tissue Engineering: Taylor & Francis Group.
85. Gao, J., Niklason, L., Langer, R. (1998) Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res*, 42 (3), 417-424.
86. Anita W. T. Shum, A.F.T.M. (2003) Morphological and biomechanical characterization of poly(glycolic acid) scaffolds after in vitro degradation *Polymer Degradation and Stability*, 81 (1), 141-149.
87. Winder, S.J., Walsh, M.P. (1993) Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell Signal*, 5 (6), 677-686.
88. Winder, S.J., Walsh, M.P. (1990) Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*, 265 (17), 10148-10155.
89. Rose, S.L., Babensee, J.E. (2007) Complimentary endothelial cell/smooth muscle cell co-culture systems with alternate smooth muscle cell phenotypes. *Ann Biomed Eng*, 35 (8), 1382-1390.
90. Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A. ve diğ erleri. (2003) PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 (2), C316-330.
91. Skalli, O., Pelte, M.F., Pecl et, M.C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G. ve diğ erleri. (1989) Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem*, 37 (3), 315-321.
92. Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhas tonay, C., Vandekerckhove, J. ve diğ erleri. (1981) Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (1), 298-302.
93. Galmiche, M.C., Koteli ansky, V.E., Briere, J., Herve, P., Charbord, P. (1993) Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 82 (1), 66-76.
94. Karnik, S.K., Brooke, B.S., Bayes-Genis, A., Sorensen, L., Wythe, J.D., Schwartz, R.S. ve diğ erleri. (2003) A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*, 130 (2), 411-423.
95. Patel, A., Fine, B., Sandig, M., Mequanint, K. (2006) Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res*, 71 (1), 40-49.
96. Winlove, C.P., Parker, K.H., Avery, N.C., Bailey, A.J. (1996) Interactions of elastin and aorta with sugars in vitro and their effects on biochemical and physical properties. *Diabetologia*, 39 (10), 1131-1139.

- 97.Li, D.Y., Brooke, B., Davis, E.C., Mecham, R.P., Sorensen, L.K., Boak, B.B. ve diğeri. (1998) Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*, 393 (6682), 276-280.
- 98.Mitchell, S.L.,Niklason, L.E. (2003) Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol*, 12 (2), 59-64.
- 99.Fietzek, P.P.,Rauterberg, J. (1975) Cyanogen bromide peptides of type III collagen: first sequence analysis demonstrates homology with type I collagen. *FEBS Lett*, 49 (3), 365-368.
- 100.Chapekar, M.S. (2000) Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res*, 53 (6), 617-620.
- 101.Grikscheit, T.C., Ochoa, E.R., Ramsanahie, A., Alsberg, E., Mooney, D., Whang, E.E. ve diğeri. (2003) Tissue-engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture. *Ann Surg*, 238 (1), 35-41.
- 102.Grikscheit, T.C., Siddique, A., Ochoa, E.R., Srinivasan, A., Alsberg, E., Hodin, R.A. ve diğeri. (2004) Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection. *Ann Surg*, 240 (5), 748-754.
- 103.Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J.J.,Atala, A. (1999) De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 17 (2), 149-155.
- 104.Talac, R., Friedman, J.A., Moore, M.J., Lu, L., Jabbari, E., Windebank, A.J. ve diğeri. (2004) Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*, 25 (9), 1505-1510.
- 105.Hertegard, S., Cedervall, J., Svensson, B., Forsberg, K., Maurer, F.H., Vidovska, D. ve diğeri. (2006) Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. *Laryngoscope*, 116 (7), 1248-1254.
- 106.Solan, A., Dahl, S.L.,Niklason, L.E. (2009) Effects of mechanical stretch on collagen and cross-linking in engineered blood vessels. *Cell Transplant*, 18 (8), 915-921.